MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXVI Agosto — 1932 Fasciculo 2

Acção do formol sobre a alexina de cobaya (*)

pelos

DRS. J. DA COSTA CRUZ e H. DE AZEVEDO PENNA

Com os methodos actuaes de technica póde-se demonstrar que a acitividade alexica dos sôros frescos de cobaya é o resultado da acção simultanea ou successiva de quatro factores que nesses sôros se encontram presentes. Dois delles são termolabeis e pódem-se isolar pelos methodos que permittem separar as globulinas das albuminas: dialyse (Ferrata 1907), acção de acidos diluidos (Sachs e Altmann 1909), agua distilada saturada de gaz carbonico (Liefmann 1909) ou precipitação pelo sulfato de ammonio (Browning e Mackie 1914); os outros dois, termo-resistentes, encontram-se ainda activos nos sôros submettidos a aquecimento, a 54° ou 56° por espaço de meia hora, e separam-se um do outro porque o terceiro se póde retirar desses sôros pelo contacto prolongado com emulsões de levedos (Coca 1914), sem todavia destruir o quarto que por sua vez pequenas quantidades de ammonia retiram sem alterar o terceiro (Gordon, Whitehead e Wormall 1926). Com o intuito de verificar se a complexidade da alexina não é ainda maior do que os dados experimentaes até agora estabeleceram, procurámos estudar a acção, que por ventura exerce o formaldehido sobre a alexina de cobaya, e são os resultados encontrados que constituem o objecto do presente trabalho.

Logo de inicio observámos que em forte concentração no sôro fresco de cobaya, isto é a 10 % ou a 1 %, o formol inactiva tanto as fracções termo-labeis como as termo-resistentes da alexina mesmo após um con-

(*) Apresentado ao Congresso Internacional de Biologia realisado em Montevidéo, Outubro 1930.

tacto de apenas 5 minutos, a 37°C. Neste praso e nesta ultima concentração, entretanto, a addição de sôro inactivado pela ammonia póde ainda determinar hemolyse total, o que mostra que é esse dos constituintes conhecidos aquelle que mais resiste á acção do formol.

Antes de continuar, e para melhor clareza da exposição, vamos resumidamente indicar a technica que empregámos nestas pesquizas.

Technica: A actividade hemolytica da alexina foi sempre determinada no volume total de 4 c.c. de liquido em presença de 1 c.c. de solução a 2,5 % de globulos de carneiro lavados e 1 c.c. de um sôro hemolytico de coelho anti-carneiro, diluido a $^1/_{210}$, e contendo nesse volume 30 a 40 unidades hemolysantes. A leitura da hemolyse foi geralmente feita no fim de meia hora de permanencia no banho maria a 37°.

As *fracções termo-labeis* de Ferrata foram sempre obtidas com excellente resultado pela technica de Liefmann, modificada por Braun: diluir sôro fresco em agua distillada gelada na razão de 1/10, fazer passar uma corrente de gaz carbonico durante 10 a 15 minutos, centrifugar a 3.500 rotações durante 5 a 10 minutos, decantar o liquido sobrenadante e reconstituir a isotonia pela addição de 1 c.c. da solução a 8,5 % de cloreto de sodio a 10 c.c. do liquido, e libertal-o finalmente do gaz carbonico por transvasamentos repetidos (Fracção albumina de Ferrata, Endstück dos autores allemães). O deposito era a seguir emulsionado e lavado em agua distillada gelada saturada de gaz carbonico e, após centrifugação dissolvido em agua physiologica (Fracção globulina de Ferrata, Mittelstück dos autores allemães). Sem nenhuma alteração desta technica o aspecto do precipitado de globulinas apresenta differenças sensiveis que por isso nos parece dependerem das qualidades dos sôros submettidos a esse tratamento: umas vezes, e é o que é mais frequente, o precipitado, ao redissolver-se em agua physiologica deixa um residuo difficilmente soluvel que por esmagamento com um bastonete de vidro toma um aspecto membranoso que lembra o de uma rêde de fibrina; outras vezes, o que é muito mais raro, o deposito tem um aspecto gommoso e dissolve-se facilmente e completamente no sôro physiologico. Em geral com o primeiro aspecto é a fracção albumina que completa melhor os sôros de que se retirou quer o terceiro quer o quarto componente da alexina; no segundo caso é principalmente á fracção globulina que cabe esse papel.

Fracções termo-resistentes: *Terceiro componente*. Como emulsão de levedo usamos uma preparação commercial denominada «Fleischmann's Yeasts» que se apresenta em tablettes constituidas por uma massa na qual os levedos estão incorporados á farinha de tapioca. O conteúdo de cada tablette era emulsionado em 20 c.c. de agua physiologica, aquecido durante

uma hora a 100° em banho maria, lavado por duas vezes em agua physiologica e o deposito finalmente emulsionado em 4 c.c. de sôro fresco de cobaya era collocado em banho maria por espaço de 2 horas a 37°. Após esse tratamento o material era centrifugado e dosado o titulo alexico do liquido sobrenadante. De regra um sôro de cobaya activo até 0,02 c.c. não dá traços de hemolyse mesmo com 0,2 c.c. depois de ter soffrido esse tratamento. O sôro após contacto com a emulsão de levedo fica ligeiramente acido mas o gráo de acidez não nos pareceu influir nos resultados que observámos e por isso pareceu-nos dispensavel neutralizal-a.

Quarto componente: Seguimos escrupulosamente a technica recommendada por Gordon, Whitehead e Wormall que nos forneceu resultados constantes e excellentes: Addicionar a cada 1 c.c. de sôro fresco de cobaya 0,25 da solução de ammonia n/6,5 deixar a mistura permanecer no banho maria a 37° por espaço de 1 hora e meia e a seguir neutralisar cuidadosamente com acido chlorhydrico n/5 isto é addicionar cerca de 0,75 c.c. de HCl n/5 a cada 4 c.c. de sôro de cobaya empregado. Terminada a preparação de cada constituinte quer termolabil quer termo-resistente, eram elles immediatamente immersos num vaso com agua gelada para melhor conservação. Com esta technica conforme se verá dos quadros adeante apresentados a differenciação destes quatro componentes é facil e perfeita.

Como acima referimos, qualquer destes constituintes da alexina é sensivel a fortes concentrações de formol e o que mais resiste é o constituinte sensivel á ammonia, de tal fórma que se pódem obter sôros tratados pelo formol que nelles, da alexina, só esse constituinte exista activo.

Se se empregar, porém, o formaldehido em concentração mais fraca, por exemplo, de maneira a formar no sôro a diluição a 1°/°° de formol do commercio, verifica-se que após 1/2 hora de banho maria a 37° o sôro de cobaya perdeu já grande parte do seu poder alexico (o titulo passou por exemplo de 0,02 c.c. para 0,2 c.c.) sem que se hajam alterado as fracções termolabeis de Ferrata, pois que a simples addição de 0,1 c.c. de sôro de cobaya, inactivado pelo calôr, permitte regenerar integralmente a actividade hemolytica. Um contacto mais prolongado, por exemplo, de 1 hora a 37° permitte obter um sôro que mesmo na dóse de 0,4 c.c. só dá traços de hemolyse ao passo que em presença de 0,1 c.c. de sôro de cobaya inactivado pelo calôr dá hemolyse total com 0,06 c.c. e hemolyse parcial mesmo com 0,02 c.c. Vê-se que neste ultimo caso o formol começa a alterar as fracções labeis e que essa alteração é de inicio só qualitativa, pois o titulo da hemolyse parcial corresponde exactamente ao titulo ori-

ginal da hemolyse total do sôro fresco, em summa, como se esses constituintes se tivessem transformado em productos de qualidade inferior e de acção mais lenta. O factor que o formol nessa concentração destróe é o terceiro componente da alexina, estudado por Coca, conforme se vê do seguinte quadro:

QUADRO I

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro formol a 1 °/oo	0,2	—	—	—	0,1 cc.	0,1	0,1	—	—	—
Sôro NH^3	—	0,2	—	—	0,1 cc	—	—	0,1	0,1	—
Sôro levedo	—	—	0,2	—	—	0,1	—	0,1	—	0,1
Sôro inact. a 56° 1/2 hora.	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	0,1	0,1
Agua physiologica	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Gbl. sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados após meia hora a 37°	0	0	0	0	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

h. t. = hemolyse total; 0 = ausencia de hemolyse

Vê-se, com effeito, que o sôro tratado pelo formol é reactivado facilmente não só pelo sôro inactivado pelo calor, como pelo sôro inactivado pela ammonia, mas pelo contrario permanece inactivo pela addição de sôro inactivado pelo levedo. Esta é em geral a regra, mas devemos assignalar como um facto seguramente bem observado que por vezes o sôro inactivado pelo levedo, isto é, sem o terceiro componente, é tambem capaz de reactivar o sôro inactivado pelo formol, sem que nos tenha sido possivel apprehender o determinismo do phenomeno. O certo é que dos constituintes conhecidos da alexina é o denominado terceiro componente que se mostra mais sensivel á acção do formol.

Se o contacto entre o formol a 1°/°° e o sôro é feito a 0°, mesmo se dura por espaço de duas horas, nenhuma alteração se dá no sôro, isto é, nem mesmo o terceiro componente é inactivado, o que faz pensar que o formol age sobre o terceiro constituinte da alexina por uma acção chimica directa. Como, comtudo, o formol possue a propriedade bem conhecida de em forte concentração gelificar os sôros, propriedade que se tem querido aproveitar para o diagnostico sôrologico da syphilis (reacção de Gaté e Papacostas), concebemos possivel a hypothese de que um principio de gelificação de certas proteinas do sôro pudesse dar origem a phenomenos de adsorpção como os que sem duvida, se passam quando se addicionam aos sôros emulsões de levedos e em consequencia dos quaes desapparece o terceiro constituinte da alexina.

QUADRO II

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro Formol a 1 °/oo	0,2 cc.	—	—	—	0,1 cc.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sôro NH^3	—	0,2 cc.	—	—	0,1 cc.	—	—	—	—	—
Sôro levedo	—	—	0,2 cc.	—	—	0,1	—	—	—	—
Sôro inactivado 56°C.	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—
Sôro inac. 56° Formol 1 °/oo	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—
Sôro inac. 56° NH^3	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—
Sôro inac. 56° levedo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1
Agua phys.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Globulos + sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados 1/2 h. a 37°	0	0	0	0	h. t.	0	h. t.	0	h. t.	h. t.

11	12	13	14	15	16	17	18	19
—	—	–	–	—	—	—	—	—
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
0,1	—	–	–	—	0,1	0,1	0,1	0,1
—	0,1	—	—	—	0,1	—	—	—
—	—	0,1	—	—	—	0,1	–	—
–	–	–	0,1	—	—	–	0,1	—
–	—	–	—	0,1	–	—	—	0,1
1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
h. t.	h. t.	h. t.	0	h. t.	h. t.	0	h. t.	h. t.

O mecanismo de acção dos levedos sobre esse constituinte é ainda obscuro, mas está hoje demonstrado que não é devida a substancias anti-alexicas formadas nas misturas de levedos e sôros frescos, nem tão pouco que a acidez que os levedos introduzem no sôro seja capaz de precipitar a fracção globulina de Ferrata. Segundo Whitehead, Gordon e Wormall (1925) parece certo, por isso, que o levedo inactiva o sôro de cobaya combinando-se physicamente ou chimicamente com um constituinte termo-resistente do sôro.

Uma experiencia que aqui vamos referir mostra no emtanto que mesmo essa ultima hypothese está longe de interpretar o verdadeiro processo que a bem dizer nos parece muito mais complicado. Com effeito, quando se procura retirar os componentes termo-resistentes da alexina, não do sôro fresco de cobaya mas do sôro de cobaya inactivado pelo calor 1/2 hora a 56°, verifica-se que o formol a 1°/°°, após contacto de 1 hora a 37°, retira-lhe o terceiro componente, mas a emulsão de levedo nada faz. Um sôro de cobaya inactivado a 56° meia hora e tratado a seguir pela emulsão de levedos, após contacto de 2 horas a 37°, conserva a propriedade de reactivar não só o sôro inactivado pela ammonia e pelo formol, mas tambem a de reactivar um *sôro fresco inactivado pela propria emulsão de levedos*, conforme se vê claramente do quadro II.

Como salta aos olhos o phenomeno de inactivação do terceiro componente da alexina pelas emulsões de levedos é muito comparavel ao que se passa quando se prepara *in vitro* anaphylatoxina de Friedberger. Tanto para a inactivação do terceiro componente como para a formação de anaphylatoxina é indispensavel a presença de substancias termo-labeis do sôro. Como Bordet mostrou, a simples addição de gelose a 0,5 % a sôro, dá facilmente origem á formação de anaphylatoxina, o que não acontece se a gelose é addicionada a sôro de cobaya inactivado pelo calor. Ora, como verificámos a gelose addicionada a sôro fresco de cobaya, conforme a technica de Bordet, após contacto de 2 horas a 37°, retira do sôro o terceiro constituinte da alexina, o que não faz ao sôro inactivado pelo calor, conforme resulta do quadro III:

Por outro lado devemos accrescentar que os sôros frescos de que se retira o terceiro componente por emulsões de levedos, conforme a technica que vimos usando, são extremamente ricos em anaphylatoxina, ao passo que os sôros inactivados pelo calor, tratados por essas mesmas emulsões, não o são. Egualmente innocuas, por inoculação intravascular, são os sôros frescos ou inactivados pelo calor de que se retirou o terceiro componente pelo formol ou o quarto pela ammonia, o que demonstra que não é só a falta do 3° componente que dá ao sôro o poder toxico.

QUADRO III

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sôro Formol	0,2	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
Sôro Gelose	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1
Sôro NH^3	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	0,1	0,1	—	—
Sôro 56º	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	—	—	—
Sôro 56º Formol	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	.	—	0,1	—
Sôro 56º Gelose	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1
Agua phys.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Globulos + sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultado	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	0	h. t.

Não padece, pois, nenhuma duvida que as condições que determinam a formação da anaphylatoxina *in vitro,* nos sôros frescos, são as mesmas que presidem á inactivação, nesses sôros, do terceiro componente da alexina por determinados colloides e merece, portanto, consideração a hypothese de que essa inactivação seja devida a phenomenos de auto-proteolyse que se dão em consequencia da adsorpção por esses colloides de substancias anti-tripticas.

BIBLIOGRAPHIA

FERRATA—Berl. klin. Woch. Vol. 44, pag. 366.
SACHS e ALTMANN—Handbuch der Path. Mikroorg. (Kolle und Wassermann), Vol. 2, pág. 476.
LIEFMANN—Munch. med. Woch. Vol. 56, pág. 2097.
BROWNING and MACKIE—Zeitschr. f. Imm. Vol. 21, pág. 422.
COCA—Zeitschr. f. Imm. Vol. 21, pág. 604.
GORDON, WHITEHEAD e WORMALL—Bioch. Journal. Vol. 20, pág. 1028.
WHITEHEAD, GORDON e WORMALL.—Bioch. Journal, Vol. 18, pág. 618.

Action of formol upon guinea pig alexin (*)

by

J. DA COSTA CRUZ, M. D. and H. DE AZEVEDO PENNA, M. D.

By the present methods of technique it can be proved that the alexic activity of fresh guinea pig sera is the result of the simultaneous or successive action of four factors which are found to be present in these sera. Two of them are thermolabile and can be isolated by the methods which allow the separation of globulins from albumins: dialysis (Ferrata 1907), action of diluted acids (Sachs and Altmann 1909), distilled water saturated by carbonic anhydride (Liefmann 1909) or precipitation by ammonium sulphate (Browning and Mackie 1914); the two others, heat stable, are found to be still active in sera subjected to heat, at 54° or 56°C. during the space of half an hour; they separate from each other because the third factor can be removed from these sera by means of a prolonged contact with yeast emulsions (Coca 1914), yet without destroying the fourth which, in its turn, can be removed by small quantities of ammonia without any alteration of the third one (Gordon, Whitehead and Wormall, 1926). For the purpose of verifying whether the complexity of alexin is not still greater than that established, up to the present, by experimental records, we tried to study the action which formaldehyde perchance may exert upon guinea pig alexin, and the results therefrom constitute the object of the present paper.

From the very first, we observed that formol, when strongly concentrated, that is at 10 % or at 1 %, inactivates both the thermolabile as well as the heat stable fractions of alexin in fresh guinea pig serum, even after a contact of scarcely 5 minutes at 37°C. In this space of time and at this concentration, however, the addition of ammonia inactivated serum can still induce complete haemolysis, a fact which shows that of the constituents known this is the one which is more resistant to the action of formol.

Before going on and for the sake of greater clearness, we shall indicate briefly the technique employed in these researches:

(*) Read before the International Congress of Biology, held at Montevideo, Oct. 1930.

Technique: The haemolytic activity of alexin has always been determined in a total volume of 4 c.c. of liquid in presence of 1 c.c. of a 2,5 % solution of washed sheep blood cells and of 1 c.c. of a haemolytic rabbit anti-sheep serum diluted at $^1/_{210}$, in this volume 30 to 40 haemolysing units being contained. The reading of haemolysis was generally made at the end of half an hour of water bath at 37°C.

Ferrata's thermolabile fractions were always obtained, with excellent result, by Liefmann's technique modified by Braun: dilution of fresh serum in iced distilled water at the rate of 1/10, passage of a current of carbonic anhydride during 10 to 15 minutes, centrifugation at 3,500 revolutions during 5 to 10 minutes, pouring of the supernatant liquid and reconstitution of isotonia by the addition, to 10 c.c. of the liquid, of 1 c.c. of a 8,5 % solution of sodium chloride, and finally liberation of the carbonic anhydride by repeated transvasing (Ferrata's albumin fraction, endpiece, Endstück of the German authors). The deposit was at once emulsioned and washed in iced distilled water saturated by carbonic anhydride and, after centrifugation, dissolved in physiologic saline (Ferrata's globulin fraction, midpiece, Mittelstück of the German authors). Without any change of this technique the appearance of the globulin precipitate presents noticeable differences which therefore seem to be dependent on the qualities of the sera subjected to this treatment: in some instances which occur more frequently, the precipitate while redissolving in physiologic saline leaves behind a residue difficult do dissolve and which being crushed by a glass rodlet takes a membranous appearance recalling that of a fibrin net; in other instances which occur much more rarely, the deposit presents a gummy appearance, easily and entirely soluble in physiologic saline. In general, the former appearance is shown by the albumin fraction which more fully completes the sera from which either the third or the fourth component of alexin was removed; in the latter case, it is mainly the globulin to which this rôle belongs.

Heat stable fractions: Third component. The yeast emulsion we used is a commercial preparation called «Fleischmann's yeast», in the shape of tablets made up of a mass in which the yeasts are embodied in tapioca flour. The contents of every tablet were emulsioned in 20 c.c. of physiologic saline, heated during one hour at 100°C. in water bath, washed twice in physiologic saline and finally the deposit, after being emulsioned in 4 c.c. of fresh guinea pig serum, was placed into water bath for the space of 2 hours at 37°C. After this treatment the material was centrifugated and the alexic title of the supernatant liquid was dosed. As a rule, a guinea pig serum active until 0.02 c.c. does not give traces of haemo-

lysis even with 0.2 c.c. after having undergone this treatment. Serum after contact with yeast emulsion turns slightly acid, but the degree of acidity, as it seemed, did not affect the results which we observed and we therefore considered its neutralization dispensable. Fourth component: We scrupulously followed the technique recommended by Gordon Whitehead and Wormall which afforded us constant and excellent results: to add to every 1 c.c. of fresh guinea pig serum 0.25 c.c. of an ammonia solution at n/6.5 to leave the mixture in water bath at 37°C. for the space of 1 hour and a half and then carefully to neutralize with hydrochloric acid at n/5, that is to add about 0.75 c.c. of n/5 HCl to every 4 c.c. of guinea pig serum employed. The preparation of each constituent either thermolabile or heat stable being achieved, they were forthwith immersed into a vessel of iced water for the sake of a better preservation. The differentiation of these four components is easy and perfect by this technique, as is to be seen from the tables given further on.

As mentioned above, any one of these constituents of alexin is sensitive to strong concentrations of formol; the ammonia sensitive constituent is however the most resistant, so that formol treated sera can be obtained in which of the constituents of alexin there remains active this constituents alone.

But if formaldehyde is employed at a weaker concentration, for instance such as to form a 1°/°° dilution of commercial formol in the serum, one verifies that after 1/2 an hour of water bath at 37°C. the guinea pig serum has already lost a part of its alexic power (the title passes, for instance, from 0.02 c.c. to 0.2 c.c.), without any change of Ferrata's thermolabile fractions, for the mere addition of heat inactivated guinea pig serum allows the integral regeneration of the haemolytic activity. A more prolonged contact, for instance such as of 1 hour at 37°C., allows a serum to be obtained which even at the dose of 0.4 c.c. gives only traces of haemolysis, whilst in presence of 0,1 c.c. of heat inactivated guinea pig serum it gives complete haemolysis with 0.06 c.c. and partial haemolysis even with 0.02 c.c. In this latter case, as it is seen, formol begins to alter the labile fractions and this alteration is initially only a qualitative one, because the title of the partial haemolysis exactly corresponds to the original title of complete haemolysis of fresh serum, in short as if these constituents were transformed into products of inferior quality and of slower action. The factor at this concentration destroyed by formol is the third component of alexin studied by Coca, as may be seen from the following table:

TABLE I

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serum Formol 1 o/oo	0.2	—	—	—	0.1 cc.	0.1	0.1	—	—	—
Serum NH^3	—	0.2	—	—	0.1 cc.	—	—	0.1	0.1	—
Serum Yeast	—	—	0.2	—	—	0.1	—	0.1	—	0.1
Serum inact. at 55o ½ hour.	—	—	—	0.2	—	—	0.1	—	0.1	0.1
Saline solution	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Read cells + Haemolytic serum	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results after half an hour at 37oC.	0	0	0	0	t. h.	0	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.

T. h. = Total haemolysis; 0 = lack of haemolysis.

It may be seen, indeed, that formol treated serum is easily reactited not only by heat inactivated serum, but also ammonia inactivated serum, whilst it remains, on the contrary, inactive on the addition of yeast inactivated serum. This being the general rule, we must point out as a fact assuredly well observed that, at times, yeast inactivated serum, i. e. that without the third component, is also able to reactivate formol inactivated serum, although we were not able to grasp the determinism of this phenomenon. What is certain is that amon gthe constituents known of alexin it is the so-called third component which proves to be more sensitive to the action of formol.

If the contact between 1o/oo formol and serum is made at 0o C., even lasting the space of two hours, no change occurs in serum, that is to say not even the third component is inactivated, a fact which makes us think that formol acts on the third constituents of alexin by means of a direct chemical action. Yet, as formol at strong concentration possesses the well known property of gelifying sera, of which property some have thought right to take advantage for serologic diagnosis of syphilis (Gaté and Papacosta's reaction), we conceived the possibility of the hypothesis that the gelification of certain proteins might originate phenomena of adsorption, such as those which, no doubt, occur when yeast emulsions are added to sera with consecutive disappearance of the third constituent of alexin.

The mechanism of the action of yeast on this constituent is, as yet, obscure, but nowadays it is proved that it is not due to antialexic substances formed in mixtures of yeasts and fresh sera, nor even that the acidity brought into serum by yeasts may precipitate Ferrata's globulin fraction. According to Whitehead, Gordon and Wormall (1925), it therefore seems to be ascertained that yeast inactivates guinea pig serum, the yeast physically or chemically combining with a heat stable constituent of serum.

An experience which we will here relate shows nevertheless that even this latter hypothesis is far from interpreting the true process which, in reality, seems to us to be much more complicated. Indeed, when one tries to remove the heat stable components of alexin, not from fresh guinea pig serum but from guinea pig serum inactivated by heating during 1/2 an hour at 56° C., one verifies that formol at 1°/°° after a contact of 1 hour at 37° C. removes therefrom the third component, ammonia removes from same the fourth component, but yeast emulsion does nothing. Guinea pig serum inactivated at 56° C. during half an hour and treated thereupon with yeast emulsion, after a contact of 2 hours at 37° C. keeps the property of reactivating not only serum inactivated by ammonia and by formol, but also that of reactivating *fresh serum inactivated by the yeast emulsion itself,* as may be plainly seen from the following table II.

It is strikingly evident that the inactivation phenomenon of the third component of alexin by yeast emulsions is, to a great extent, comparable to that which occurs when Friedberger's anaphylatoxin is being prepared in vitro. Both for the inactivation of the third component as well as for the formation of anaphylatoxin, the presence of thermolabile substances of serum is indispensable. As Bordet has shown, the mere addition of gelose at 0.5 % to serum easily originates the formation of anaphylatoxin, the same not taking place if gelose is added to heat inactivated guinea pig serum. Now, as we verified, gelose added to fresh guinea pig serum according to Bordet's technique, after a contact of 2 hours at 37° C. removes from serum the third constituent of alexin, and does not remove the same from heat inactivated serum, as results from the following table III.

On the other hand, we must add that fresh sera, from which the third component is removed by yeast emulsions according to the technique we used to apply, are extremely rich in anaphylatoxin, whilst heat inactivated sera treated with these same emulsions are not. Fresh sera or those inactivated by heat from which the third component has been removed by formol of the fourth component by ammonia are likewise innocuous by intravascular inoculation, a fact which proves that it is not the lack of the third component alone which confers the toxic power on serum.

No doubt can therefore be admitted that the conditions which in fresh sera determine the formation of anaphylatoxin in vitro are the same which in these sera preside over the inactivation of the third component of alexin by certain colloids; therefore the hypothesis that this inactivation may be due to phenomena of auto-proteolysis which take place consecutive to the adsorption of anti-tryptic substances by these colloids deserves to be taken into consideration.

TABLE II

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Serum Formol 1 °/oo	0.2 cc.	—	—	—	0.1 cc.	0.1	0.1	0.1	0.1
Serum NH^3	—	0.2 cc.	—	—	0.1 cc.	—	—	—	—
Serum Yeast	—	—	0.2 cc.	—	—	0.1	—	—	—
Inactivated serum at 56°C.	—	—	—	0.2	—	—	0.1	—	—
Inact. serum at 56° Formol 1 °/o	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—
Inactivated serum at 56° NH^3	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1
Inactivated serum at 56° Yeast	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Physiol. saline	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Read cells + Haemolytic serum	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results after 1/2 h. at 37°C.	0	0	0	0	t. h.	0	t. h.	0	t. h.

0	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	—	—	—	—	—	—	–	–	—
–	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	–	—
–	0.1	–	–	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1
–	—	0.1	—	—	—	0.1	—	–	–
–	–	–	0.1	—	–	—	0.1	–	—
–	—	–	–	0.1	—	–	—	0.1	—
1	—	—	—	—	0.1	—	—	–	0.1
8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	1 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
h.	t. h.	t. h.	t. h.	0	t. h.	t. h.	0	t. h.	t. h.

TABLE III

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Serum Formol	0.2	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—
Serum Gelose	—	0.2	—	—	0.1	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1
Serum NH^3	—	—	0.2	—	—	0.1	—	—	—	0.1	0.1	—	—
Serum at 56°	—	—	—	0.1	—	—	0.1	—	—	—	—	—	—
Serum at 56° Formol	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—	0.1	—
Serum at 56° Gelose	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—	0.1
Phys. saline	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Read cells + Haemolytic serum	2 cc.	2. cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results	0	0	0	0	0	t. h.	t. h.	0	t. h.	t. h.	t. h.	0	t. h.

Constituição da alexina e mechanismo da hemolyse especifica

pelos

DRS. J. DA COSTA CRUZ e H. DE AZEVEDO PENNA

Em 1888, em memoravel trabalho, submettendo a theoria da phagocytose á minuciosa analyse, Nuttall descobriu o poder bactericida do sangue. Verificou logo que, com excepção do cammondongo, todos os animaes de sangue quente examinados, homem, cão, carneiro, coelho, etc., apresentavam essa propriedade com grande constancia em face de varias especies microbianas e que se o sangue provinha de animaes que tinham sido préviamente submettidos á immunização essa propriedade era ainda mais exaggerada. Segundo Nuttall a phagocytose só intervinha quando as bacterias se achavam mortas ou sufficientemente attenuadas pela acção das propriedades bactericidas do liquido sanguineo, estabelecendo assim os fundamentos do estudo que só 20 annos mais tarde Wright havia de realisar sobre opsoninas. Nuttall verificou tambem logo que a propriedade bactericida se gastava durante a acção bactericida e que era por isso em parte proporcional á quantidade de bacterias postas em presença do sangue. Por outro lado estabeleceu que essa propriedade era muito instavel e desapparecia rapidamente pela conservação á temperatura ambiente ou pelo aquecimento a 55°C. durante meia hora, o que levou a crêr que fosse devido á acção de um fermento.

No anno seguinte Buchner confirmou todos os resultados de Nuttall e em 1890, submettendo os sôros á dialyse, poude affirmar que a propriedade bactericida era attributo de uma substancia albuminoide que para exercer a sua actividade exigia um estado physico especial, isto é, um arranjo particular das molleculas de albumina dentro dos grupos maiores das micelas. A' essa substancia deu Buchner, em 1891, o nome de alexina. O estudo da alexina fez poucos progressos até 1894, quando em consequencia da descoberta do phenomeno de Pfeiffer tomou novo incremento. Na intensa investigação que então em torno delle se fez são de relevancia os trabalhos de Bordet. Esse autor demonstrou de maneira mais cabal que a acção bactericida era o resultado da actividade simultanea de duas substancias differentes, uma especifica, relativamente termo-resistente que

denominou *sensibilizadora* e outra, não especifica, que pelas suas propriedades termolabeis correspondia á alexina de Buchner. Ao mesmo tempo Bordet verificou que a propriedade lytica da alexina não se limitava a agir sobre os sêres com vida autonoma, mas se podia extender a elementos cellulares de organismos superiores como globulos vermelhos e, demonstrando que a hemolyse produzida pelos sôros obedecia ás mesmas leis que regiam a bacteriolyse, tornou, graças á simplificação da technica, possivel de ser levada a analyse do problema a um grao que estava longe de ter podido attingir. Com essa analyse origina-se uma controversia entre Bordet e Ehrlich com seus collaboradores, da qual resulta a verificação assaz curiosa de que a substancia termo-resistente e especifica dos sôros póde adherir ás bacterias ou ás hematias na ausencia da alexina e que sem essa adhesão a alexina não exerce nenhuma acção hemolytica ou bacteriolytica. Durante alguns annos os trabalhos que versaram sobre este assumpto não alteraram as noções até ahi adquiridas sobre a constituição da alexina.

Em 1907, inesperadamente, Ferrata, retomando o estudo acima citado de Buchner a proposito da acção da dialyse sobre a alexina, verificou que essa substancia não é simples, mas constituida de facto por dois elementos, um dos quaes precipita em agua distillada ao passo que o outro permanece soluvel. Isoladamente qualquer delles é incapaz de determinar a hemolyse de globulos sensibilizados o que sem embargo rapidamente fazem se forem addiccionados simultaneamente a globulos e sensibilizadora. Estes interessantes resultados foram logo confirmados por numerosos autores, melhorados os processos de separação desses dois elementos e Brand ainda no mesmo anno não só mostra que ambos são termolabeis como a propria alexina, mas tambem que a parte precipitada pela agua distillada, a parte globulina, redissolvida em agua physiologica adhere directamente aos globulos sensibilizados (Mittelstück) e sem essa adhesão a fracção soluvel em agua distillada (Endstück) não póde exercer nenhuma actividade, comportando-se, portanto, esta ultima, em relação á primeira, como a alexina em relação á sensibilizadora.

Michaelis e Skwirsky verificam que se a concentração dos ions H é de (H') $3{,}8.10^{-6}$ a fracção globulina adhere aos globulos sensibilizados e póde então ser aquecida a 56° sem perder a sua actividade, mas a fracção albumina permanece livre no liquido e não ha, por consequencia, hemolyse. Aos globulos assim carregados de sensibilizadora e Mittelstück, denominou Michaelis, globulos persensibilizados. Logo a seguir Skwirsky assignala que na maior parte das reacções de Bordet e Gengou (Reacção de Wassermann, sôro tuberculoso e tuberculina, sôro precipitante e precipitinogenio homologo) a parte da alexina correspondente á fracção albumina

permanece livre no liquido e que a ausencia da hemolyse do systema hemolytico é devida á falta exclusiva da fracção globulina. A necessidade da collaboração de duas substancias para que se revelasse a propriedade alexica estava assim bem estabelecida pelas mais variadas technicas e o estudo das propriedades da alexina levou, de então em deante, em conta a complexidade d'esse agente.

Retomando, em 1912, o estudo da acção inactivante do veneno de cobra sobre a alexina, Ritz é levado a admittir que além das duas fracções descobertas por Ferrata mais uma e esta relativamente termoresistente é indispensavel para que se exerça a actividade alexica. Com effeito nos sôros assim inactivados a regeneração da alexina se faz facilmente pela simples introducção de sôro de cobaya inactivado pelo calor, d'onde se tem forçosamente que concluir que os componentes de Ferrata lá existem na quantidade necessaria. Liefmann, opondo-se a esta maneira de ver, achou antes razoavel, dada a complexidade do veneno de cobra, que a sua mistura com sôro fresco poderia alterar de tal fórma o meio ambiente que o tornasse improprio para o processo de hemolyse. A addicção de sôro inactivado teria como resultado recompôr, em parte ou no todo, as condições primitivas. Já Noguchi e Brofenbrenner tinham encarado por egual modo a dissociação das fracções termolabeis de Ferrata. Acreditavam esses autores que a actividade alexica era exclusivamente obra da fracção albumina, e que a fracção globulina pelo seu caracter anfotero apenas concedia ao meio as condições de reacção indispensaveis para se poder realizar o processo. Em 1914, porém, Coca demonstrou que cabia a Ritz razão quando affirmava a existencia de um componente termoresistente da alexina. Estudando a acção antialexica exercida por emulsões de levedos e orgãos, que tinha sido observada por V. Dungern, já em 1901, chegou de facto á verificação de que os sôros por esses meios inactivados eram como os inactivados pelo veneno de cobra, capazes de readquirir a sua primitiva actividade pela addição de sôro inactivado pelo calor. Com este novo methodo de exame a objecção de Liefmann desapparece, pois é difficil encontrar outra interpretação para explicar a influencia das emulsões de levedo que não seja baseada n'um processo de adsorpção. Ainda nesse anno, Ritz e Sachs observam que esse terceiro componente póde ser, tambem, retirado dos sôros frescos por emulsões bacterianas sobretudo de *B. prodigiosus*. Omorokow, Sachs e Omorokow, accentuam a importancia da concentração para a inactivação pelo veneno de cobra e pelas emulsões bacterianas. N'esse mesmo anno ainda Nathan confirma os resultados do anno anterior de Weil, segundo os quaes os globulos sensibilisados postos em contacto com sôro de cobaya inactivado pelo veneno de cobra ou por emulsões bacterianas se carregam tanto com a fracção

globulina como com a fracção albumina de Ferrata e denomina os globulos n'essas condições de hypersensibilizados.

Ritz e Sachs, em 1917, estudando o mecanismo da inactivação da alexina pelas emulsões bacterianas approximam-o do da formação da anaphylatoxina *in vitro*. Nessa mesma occasião Nathan, assignala que tanto o veneno de cobra quanto as emulsões bacterianas são incapazes de retirar ao sôro inactivado pelo calor o terceiro componente que n'elle se encontra activo. Em 1930, Cruz e Penna, não só confirmam esse ultimo resultado de Nathan, mas assignalam que o formaldehydo em condições determinadas retira o terceiro componente, tanto aos sôros frescos como aos que foram préviamente inactivados pelo aquecimento meia hora a 55°.

Bem estabelecida assim a existencia do terceiro componente, não parou ahi a complexidade da alexina, pois que em 1926, Gordon Whitehead e Wormall ao estudar a acção dos fermentos proteolyticos sobre a alexina têm a opportunidade de verificar que ella póde ser inactivada por pequenas quantidades de ammonia e que essa inactivação corre por conta, não da destruição do terceiro componente nem das fracções termolabeis de Ferrata, mas de uma outra termoresistente que denominaram *quarto componente*.

Deve-se portanto admittir actualmente que a alexina é com effeito constituida por quatro elementos: um termolabil que apresenta todas as propriedades physico-chimicas das globulinas; outro tambem termolabil apresentando as propriedades das albuminas (pseudo globulinas), outros dois termoresistentes, o chamado terceiro componente que se retira dos sôros frescos pela acção do formol ou do veneno de cobra, emulsões bacterianas, de orgãos ou de levedos em geral acções de adsorpção, e finalmente um quarto componente tambem termoresistente que desapparece dos sôros frescos ou inactivados quando se lhes addicionam pequenas quantidades de ammonia.

Constituintes termoresistentes.

Quando se estudam os factores que exercem qualquer acção nociva sobre a propriedade alexica a grande difficuldade, certamente a maior, está em saber se essa acção se faz sentir directamente sobre a alexina ou sobre o meio extremamente complexo em que ella exerce a sua actividade. Em alguns casos se verifica que esta ultima hypothese é facilmente demonstravel, assim além de certos limites de pH, tanto para a zona alcalina como para a zona acida, a hemolyse especifica é inhibida, mas essa inhibição cessa se a reacção é de novo ajustada a um pH nas visinhanças da

neutralidade. Nas soluções hypertonicas dos saes neutros, como o proprio chloreto de sodio, a hemolyse tambem não se dá mas basta reduzir no liquido o teôr do sal ou por diluição em agua distillada ou por dialyse para ver reapparecer a actividade alexica se se attinge de novo a isotonia. Em outros casos porém a duvida é mais difficil de esclarecer. E' o que acontece, por exemplo, com a simples inactivação pelo calor.

Com effeito se se aquece sôro fresco de cobaya por espaço de meia hora em banho maria a 54° (temperatura rigorosamente controlada), verifica-se que na dóse de 0,5 c.c. posto em presença de globulos sensibilizados por 40 unidades hemolyticas por espaço de meia hora a 37°, não dá traços de hemolyse. Se todavia, se lhe addicciona quer a fracção globulina quer a fracção albumina de Ferrata, na dóse de 0,1, (separação perfeita, não dando traços de hemolyse na dóse de 0,2 c.c. qualquer d'ellas separadamente) o sôro aquecido a 54° dá hemolyse total rapida com 0,1 c.c. E' pois evidente que a inactivação da alexina nessa temperatura não corre exclusivamente por conta duma destruição de qualquer desses dois elementos. Ainda facto mais curioso é que se se abandona um tal sôro por espaço de 18 a 20 horas á temperatura de 5° a 6°, elle readquire parcialmente a sua actividade hemolytica, dando hemolyse total com a mesma emulsão de globulos, como acima fortemente sensibilizados, mesmo na dóse de 0,2 c.c. em meia hora de banho maria a 37°. Por outro lado o sôro fresco conservado na mesma temperatura de 6° durante o mesmo periodo de tempo não apresenta augmento nenhum do titulo alexico, como rigorosamente verificamos, parece pois evidente que a inactivação corre por conta ou da destruição de uma outra fracção termolabil até agora não assignalada ou de uma alteração do meio até certo ponto reversivel e esta ultima hypothese não é a menos plausivel. Em vista disso podia-se perguntar se a inactivação a 55° ou 56° não altera o meio da mesma fórma mas apenas com maior intensidade e de modo irreversivel. Todos os autores entretanto acreditam que não, pois que o sôro assim inactivado não apresenta a maior parte das vezes acção anticomplementar apreciavel e por outro lado, não produz hemolyse pela addição das fracções labeis separadamente. Pensamos que a questão de saber se a inactivação dos sôros corre por conta de uma modificação do meio, ou da destruição de um dos constituintes da alexina, é difficil de resolver mas não impossivel, pelo menos em alguns casos, como adeante veremos.

Devemos tambem preoccupar-nos em estabelecer claramente o que se entende por alexina. Essa substancia póde revelar-se nos sôros frescos por propriedades lyticas, (bactericidas) por propriedades opsonizantes e por propriedades conglutinantes. Todavia tanto as propriedades opsoni-

zantes (Gordon, Whitehead, Wormall) como as propriedades conglutinantes (Bordet) pódem existir em sôros incapazes já de produzir a hemolyse por falta de uma das fracções da alexina. Quando aqui falamos de alexina queremos exprimir com essa palavra a capacidade integral dos sôros frescos de produzirem a hemolyse em presença de globulos sensibilizados.

A technica que empregamos nestas pesquizas já foi descripta em trabalho anterior e nada temos a accrescentar-lhe. As reacções de hemolyse foram sempre feitas em 4 c.c. de liquido. Usamos sempre em cada tubo 1 c.c. da solução a 2,5 % de globulos de carneiro lavados, misturados a 1 c.c. de sôro hemolytico de coelho anti-carneiro contendo 40 unidades hemolysantes, que correspondia a uma diluição de $^1/_{210}$ do sôro hemolytico inactivado de coelho. As fracções do complemento foram obtidas, as termolabeis pelo methodo de Liefmann ligeiramente modificado: diluição ao decimo do sôro fresco de cobaya em agua distillada gelada, passagem de gaz carbonico por espaço de 13 minutos, centrifugação e lavagem do deposito em agua distillada gelada e saturada de gaz carbonico. Reconstituição da isotonia e do pH. As fracções termoresistentes eram obtidas: o terceiro componente por adsorpção com emulsões de levedos (Fleichmam's Yeasts), que permaneciam em contacto com sôro fresco a 37° por espaço de 2 horas; a fracção correspondendo ao quarto componente era obtida segundo a technica de Gordon, Whitehead e Wormall, addicionando a cada 2 c.c. de sôro fresco 0,5 de uma solução de ammonia a n/6,5., deixando em contacto a 37° em banho maria por espaço de hora e meia e finalmente neutralizando com acido chlorhydrico n/5 de modo a reconstituir o pH anterior, isto é, addiccionando cerca de 0,37 c. c. Para retirar o terceiro componente pelo formol, addicionavamos a cada 2 c.c. de sôro fresco de cobaya 0,2 c.c. de uma solução a 1/100 de formol do commercio e deixava-se a mistura por espaço de uma hora em banho maria a 37°.

Mecanismo da acção do formol sobre a alexina de cobaya. — No nosso trabalho anterior já accentuámos que só excepcionalmente os sôros inactivados pelo formol pódem reactivar o sôro inactivado pelas emulsões de levedo. As numerosas experiencias que até esta data fizemos levam-nos a identificar de modo seguro o componente inactivado pelo formol ao terceiro componente de Ritz e Coca. O mecanismo segundo o qual essa inactivação é feita, podia attribuir-se a uma adsorpção do terceiro componente por productos do sôro alterados physicamente pelo formol pois é bem conhecida a acção gelificante d'essa substancia. Seria assim uma acção semelhante á que exercem as emulsões de levedos, de bacterias de orgãos, etc. De facto não é. Como já fizemos notar no trabalho anterior, existe

uma differença fundamental entre o formol e esses colloides. Emquanto estes são impotentes para retirar ao sôro de cobaya inactivado pelo calor o terceiro componente o formol ao contrario retira tanto d'esse sôro como do sôro fresco o terceiro componente. A acção do formol talvez se possa attribuir a um processo de oxydo-reducção semelhante ao que se passa no leite fresco na reacção de Shardinger. Tal como n'esse caso o formol só age em meio neutro ou melhor ligeiramente alcalino como mostra a seguinte experiencia:

Em tres tubos de agglutinação collocaram-se 2 c.c. de sôro fresco de cobaya em cada um. Ao primeiro addicionou-se uma gotta de acido chlorhydrico n/1 ao segundo 1 gotta de agua physiologica, ao terceiro duas gottas de soda n/1, a cados em banho maria a 37° durante meia hora foram dosados no seu teôr alexico seguir a todos tres 0,2 c.c. da solução a 1/100 de formol do commercio. Collosobre globulos fortemente sensibilizados.

Os resultados veem-se no quadro I em que a leitura da hemolyse foi feita após meia hora de banho maria a 37°C.

Vê-se claramente que a acção do formol é praticamente nulla em meio acido e muito intensa em meio alcalino.

Repetida a experiencia addicionando a cada tubo, 0,2 c.c. da solução a 1/10 de formol, obtivemos ao fim de 15 minutos de banho maria a 37° o resultado seguinte:

Sôro formol 1 % acido — actividade alexica 0,1—hemolyse total.
Sôro formol 1 % neutro—actividade alexica 0,5—ausencia de hemolyse.
Sôro formol 1 % alcalino—actividade alexica 0,5—ausencia de hemolyse.

Verificámos que no segundo e no terceiro tubo não só o terceiro mas os dois componentes termolabeis da alexina tinham sido destruidos.

E' opportuno notar que tal como acontece á inactivação do terceiro componente da alexina pelo formol, se se faz a reacção de Shardinger em leite fresco ou aquecido a 56° meia hora, os resultados da reducção do azul de methyleno pela addição de formol não differem, mas o mesmo não acontece quando se varia a reacção do meio ou a concentração do formol.

Experiencia n°. I—Em uma serie de pequenos tubos para agglutinação foram collocados 2 c.c. de leite fresco e addicionados ao 1° tubo 0,2 c.c. de formol a 1/10, ao segundo 0,2 c.c. de formol a 1/100, ao terceiro 0,2 c.c. de formol a 1/1000 e ao quarto 0,2 c.c. de formol a 1/10.000.

Uma serie identica foi feita com leite fresco aquecido meia hora a 56°. Addicionaram-se a todos os tubos tres gottas de azul de methyleno a 1 %.

QUADRO I

Sôro a 56º.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,2
Sôro formol 1/1000 acido.	0,2	0,1	0,06	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro formol 1/1000 neutro.	—	—	—	—	0,2	0,1	0,06	0,02	—	—	—	0,03	—	—
Sôro formol 1/1000 alcalino	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	0,2	0,1	—	0,1	—
Agua physiologica	1,8	1,9	1,94	1,98	1,8	1,90	1,94	1,98	1,66	1,8	1,9	1,87	1,8	1,2
Globulos Sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	0	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	0

H. t. = Hemolyse total.

0 = Ausencia de hemolyse.

Resultados ao fim de 10 minutos a 40º: Descoramento nos segundos tubos de cada serie. Nos outros não ha alteração. Ao fim de meia hora o aspecto é o mesmo com a differença que nos primeiros tubos embora não haja descoramento se observa uma ligeira alteração da tonalidade do azul de methyleno.

Experiencia nº. II—Uma partida de leite fresco foi distribuida na dóse de 10 c.c. em tres tubos de ensaio. O primeiro tubo foi addicionado de 0,2 c.c. de acido chlorhydrico n/1, de modo a dar uma reacção francamente acida ao tornesol, ao terceiro addicionaram-se 0,2 c.c. de soda n/1, de fórma a obter uma reacção nitidamente alcalina ao tornesol, o segundo verificou-se que dava uma reacção neutra ao tornesol.

Essas tres amostras de leite fresco foram distribuidas cada uma em uma serie de tubos de hemolyse na dóse de 2 c.c., aos quaes a seguir se addicionaram 3 gottas de azul de methyleno a 1 % e 0,2 c.c. de formol do commercio em quantidades decrescentes, isto é: 1/10, 1/100, 1/1.000, e 1/10.000.

Collocados os tubos a 40º ao fim de 5 minutos observou-se descoramento completo do corante no tubo contendo formol a 1/1.000 na serie de leite alcalinizado. Ao fim de 20 minutos descoramento do tubo correspondente da serie de leite neutro. Ao fim de duas horas nenhum dos tubos da serie acida apresentava traços de descoramento.

Não deixa, portanto, de ser curioso que a acção do formol sobre o terceiro componente da alexina se exerça não só dentro das concentrações optimas para a reacção de Shardinger como dentro dos mesmos limites de reacção do meio. Estamos pois em crêr que, embora não se obtenha descoramento do azul de methyleno pela addição de formol ao sôro fresco, a acção d'esta substancia sobre o terceiro componente se deve exercer, como na reacção de Shardinger, por uma via indirecta.

Em face d'esses resultados pareceu-nos razoavel estudar o papel que outros reductores mais energicos por ventura exerceriam sobre a alexina.

Acção do hydrosulphito de sodio sobre alexina de cobaya.

Pesquizando n'esse sentido encontrámos no estudo da acção do hydrosulphito de sodio sobre sôro fresco de cobaya resultados interessantes. Depois de alguns ensaios verificámos que esse corpo exerce uma acção inactivante sobre o complemento, sem em nada alterar os componentes labeis da alexina se é misturado no sôro de modo a formar nelle a solução a 1/100, conforme se vê da seguinte experiencia:

A 2 c.c. de sôro fresco de cobaya são addicionados 0,02 grs. de $S^2O^4Na^2$ (Kahlbaum) crystalizado, que por ligeira agitação entra rapidamente em solução. Colloca-se o material em banho maria a 37º por espaço de 1/2 hora, finda a qual se neutraliza a mistura pela addição de duas gottas de soda normal. Colloca-se a

seguir o tubo com esse sôro immerso em agua gelada. O quadro II mostra não só que a inactivação do terceiro componente é perfeita mas que não houve mesmo ligeira diminuição do teôr do sôro nas fracções labeis que se encontram na concentração inicial do sôro fresco.

Como se vê a addição de sôro inactivado pelo calôr restitue integralmente a actividade alexica ao sôro inactivado pelo hydrosulphito.

Além do sôro inactivado pelo calor, o sôro inactivado pelo hydrosulphito póde ser reactivado não só pelo sôro inactivado pela ammonia como pelo sôro inactivado pelo formol ou pela gelose. A reactivação pelo sôro inactivado pelo levedo ou não se dá ou se dá só de modo incompleto, o que as mais das vezes succede como mostra o quadro III.

E' portanto evidente que o hydrosulphito destróe um componente termo-resistente da alexina differente daquelle que destróe o formol. Ambos porém não são completados pelo sôro tratado pelo levedo o que significa que ambos devem estar comprehendidos naquillo que se chama terceiro componente. E' tambem curioso notar que os sôros de que se retira o terceiro componente pela gelose, como mostram os tubos n°s. 16 e 17, não completam o sôro tratado pelo formol mas completam bem o sôro inactivado pelo hydrosulphito. E' fóra de duvida pois que este chamado terceiro componente é constituido ao menos por duas substancias differentes, facto que aliás o estudo da adhesão dos componentes da alexina aos globulos sensibilizados, como veremos adeante, claramente confirma.

A acção inactivante do hydrosulphito exerce-se tanto no sôro fresco como no sôro inactivado pelo calôr. E' o que tambem se dá com a ammonia e o formol e o contrario do que se passa com a gelose e as emulsões de levedo.

Vêja-se o quadro IV.

QUADRO IV

TUBOS	1	2	3	4	5
Sôro. $S^2O^4Na^2$.	0,2	—	—	0,1	0,1
Sôro 56°.	—	0,2	—	0,1	—
Sôro 56° $S^2O^4Na^2$.	—	—	0,2	—	0,1
Agua physiologica.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	h. t.	0

h. t. = Hemolyse total.
0 = Ausencia de hemolyse.

QUADRO II

Sôro fresco.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro $S^2O^4Na^2$.	0,2	0,15	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,2	0,15	0,1
Sôro 56º.	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1
Agua physiologica.	1,8	1,85	1,9	1,92	1,94	1,96	1,98	1,99	1,7	1,75	0,8
Glob. sensibilisados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.

0 = Ausencia de hemolyse.
H. t. = Hemolyse total.

QUADRO III

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1
Sôro NH_3.	0,1	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Sôro Levedo.	—	0,2	—	—	—	-	0,1	—	—	—	—	0
Sôro Gelose.	—	—	0,1	—	—	—	—	0,05	—	—	—	0
Sôro Formol.	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	—	-
Sôro $S^2O^4Na^2$.	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	-
Sôro 56º.	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	-
Agua physiologica	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,85	1,8	1,8	1,8	1
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2
Resultados com 1/2 h. 37º.	0	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	

H. t. = Hemolyse total.
H. p. = Hemolyse parcial.
0 = Ausencia de hemolyse.

—	—	—	—	—	—	0,04	0,02	0,01
0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	—	—	—	—
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	—	—	—
0,82	9,84	0,86	0,88	0,89	1,8	1,96	1,98	1,99
2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	traços	0	h. t.	h. t.	traços

2	13	14	15	16	17	18	19	20	21
-	—	—	—	—	—	—	—	—	—
,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
,05	—	—	—	0,05	0,05	0,05	—	—	—
—	0,1	—	—	0,1	—	—	0,1	0,1	—
-	—	0,1	—	—	0,1	—	0,1	—	0,1
—	—	—	0,1	—	—	0,1	—	0,1	0,1
,85	1,8	1,8	1,8	1,85	1,85	1,85	1,8	1,8	1,8
cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
)	0	h. p.	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

As fracções labeis que permanecem activas nos sôros inactivados quer pela ammonia quer pelo formol ou pelo hydrosulphito pódem ser facilmente separadas em agua distillada pela precipitação pelo gaz carbonico. Verifica-se então que quer a fracção globulina quer a fracção albumina que se obtem, isoladamente ou cada uma de per si, addicionadas a sôro inactivado pelo calor são incapazes de produzir a hemolyse de globulos sensibilizados. Esta se dá todavia se se fazem agir as duas simultaneamente em presença de sôro inactivado pelo calôr.

O mecanismo de inactivação do sôro fresco pelo hydrosulphito é de suppôr se faça por meio de uma reducção directa de certa substancia do sôro; o do formol já vimos que apresenta muitas analogias com o da reducção do azul de methyleno no leite fresco na reacção de Shardinger; o das substancias adsorventes, levedos, gelose, etc. não parece facil apurar experimentalmente com sufficiente gráo de certeza.

Pelo facto que esses adsorventes não retiram o terceiro componente ao sôro inactivado pelo calor, poder-se-ia pensar que para essa inactivação são indispensaveis substancias termolabeis a que ella, essencialmente, fosse devida. Não deixaria de ser plausivel que essas substancias adsorvessem não directamente o terceiro componente, mas substancias anti-fermentativas cuja retirada do sôro trouxesse como consequencia a destruição do terceiro componente por fermentos activos. E' o que já fizemos sentir no trabalho anterior. A favor d'essa hypothese falaria não só o facto de que a acção d'essas substancias para se tornar effectiva necessita por vezes um tempo de contacto mais ou menos longo com o sôro, mas tambem a estreita relação que existe entre a formação de anaphylatoxina n'esses sôros e a inactivação do terceiro componente. Não devendo prevalecer essa hypothese, seria obrigadamente necessario admittir que o sôro inactivado pelo calor exerce uma acção inhibidora sobre a acção inactivante d'esses adsorventes. No primeiro caso é evidente que essas substancias addicionadas a uma mistura de sôro fresco e sôro aquecido a 56° deveriam poder destruir o terceiro componente do sôro inactivado na mistura; na segunda hypothese seria de esperar o contrario. Fizemos pois a experiencia seguinte visando colher esses resultados:

Em um tubo de hemolyse collocou-se 1 c.c. de sôro fresco de cobaya e a seguir mais 1 c.c. do mesmo sôro inactivado pelo aquecimento em banho maria a 56° meia hora. Depois de ligeira agitação para bôa mistura addicionou-se uma quantidade de levedos lavados representando meia pastilha de Fleishmann's Yeasts. Após agitação energica afim de obter uma emulsão homogenea, collocou-se o tubo

em banho maria a 37° por espaço de 2 horas. Dois tubos testemunhos acompanharam a experiencia, um contendo 2 c.c. de sôro fresco e correspondente quantidade de levedo e outro contendo 2 c.c. de sôro inactivado a 56° e egual quantidade da emulsão de levedos.

Após energica centrifugação d'esses tres tubos os liquidos foram decantados e dosados no seu teôr em terceiro componente. (Vide quadro V).

Conforme se vê do quadro acima a emulsão de levedo empregada reduziu consideravelmente a actividade alexica do sôro fresco (tubos 2 a 4) sem alterar os componentes labeis desse sôro (tubo 5). Essa mesma emulsão nem de leve attingiu o terceiro componente do sôro inactivado pelo calor pois conforme mostra (tubos de 10 a 21) o quadro esse sôro depois de contacto com o levedo reactiva o sôro fresco tratado pelo levedo no mesmo titulo que o sôro inactivado pelo calor que não esteve em contacto com a emulsão de levedos.

No entanto a mistura de sôro fresco com sôro a 56° tratada pelo levedo apresenta uma nitida diminuição da actividade alexica, diminuição que desapparece pela addição de sôro a 56° (tubos 6 a 9). No tubo 7 não houve traços de hemolyse embora nelle se contivessem 0,05 c.c. de sôro fresco mais 0,05 de sôro inactivado, isto é, 2 dóses hemolysantes de alexina em fracções labeis e 5 dóses hemolysantes em 3° componente. E' fóra de duvida, portanto, que a emulsão de levedos foi capaz de retirar grande parte do 3° componente do sôro inactivado pelo calor que existia nessa mistura.

Tudo se passa como se para a inactivação da alexina pelas emulsões de levedo fosse indispensavel a presença de substancias termolabeis as quaes seriam causa directa da destruição do terceiro componente.

Não obstante a claresa d'estes resultados cumpre não esquecer que nas reacções de floculação como a da toxina diphterica pela sua antitoxina, o tratamento prévio do sôro pelo calor, não só altera o titulo do optimo de floculação mas retarda ás vezes consideravelmente o apparecimento e formação do precipitado especifico. Se se leva agora em consideração que a gelose produz no sôro fresco de cobaya um precipitado que possivelmente as emulsões de levedo tambem produzem, a conclusão apparentemente tão evidente exposta acima não póde ser acceita sem reservas. Todavia ainda em apoio della desejamos lembrar o facto bem estabelecido por Omorokow de que a simples diluição do sôro fresco em agua physiologica é sufficiente para prejudicar ou abolir a acção inactivante das emulsões de levedo, o que parece indicar a necessidade de uma concentração minima de substancias termo-labeis no sôro fresco para que se realise esse processo.

QUADRO V

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro fresco	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro fresco + levedo	—	0,4	0,3	0,2	0,05	—	—	—	—	0'1
Sôro fresco + Sôro 56º + levedo	—	—	—	—	—	0,3	0,2	0,1	0,05	—
Sôro 56º + levedo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1
Sôro 56º	—	—	—	—	0,05	—	—	—	0,05	—
Agua physiologico	1,98	1,6	1,7	1,8	1,8	1,7	1,8	1,9	1,85	1,6
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	h. t.	traços	0	0	h. t.	h. t.	h. p.	0	h. t.	h. t.

h. t. = Hemolyse total.

h. p. = Hemolyse parcial.

0 = Ausencia de hemolyse.

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,05	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001
1,85	1,87	1,89	1,895	1,898	1,899	1,88	1,89	1,895	1,898	1,899
2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
h. t.	h. t.	h. p.	h. p.	h. p.	0	h. t.	h. p.	h. p.	h. p.	0

Do que ficou exposto, resulta que a complexidade do complemento é maior do que se tem até aqui acreditado e que pelo menos cinco elementos differentes se pódem nelle demonstrar.

Ordem de successão da adsorpção dos differentes elementos da alexina na hemolyse especifica.

Já vimos acima que a alexina não é um composto chimico formado pelas duas fracções termolabeis de Ferrata. A actividade alexiça, como mostrou Brand, é o resultado da acção dessas duas substancias isoladamente, agindo uma depois da outra. Vimos que os globulos sensibilizados pódem fixar a fracção globulina sem se hemolysarem e que para a sua hemolyse posterior, embora bem lavados com agua physiologica, basta addicionar-lhes a fracção albumina. Empregando um methodo semelhante, vimos tambem que Weil poude demonstrar a fixação sobre globulos sensibilizados não só da fracção globulina como o da fracção albumina, sem obter hemolyse, misturando-os com sôro fresco da cobaya de que havia retirado o terceiro componente. Depois de bem lavados esses globulos hemolysavam-se pela simples addição de sôro de cobaya inactivado pelo calôr. A esses globulos, vimos tambem que Nathan confirmando esses resultados denominou *hypersensibilizados*. Em resumo no estado actual da questão a actividade alexica é o resultado de uma serie de adhesões de tres substancias nesta ordem: *Globulos sensibilizados — Fracção globulina termolabil — Fracção Albumina termolabil — Componente termoresistente ou terceiro componente.*

Para confirmação destes resultados e verificação da ordem de adsorpção dos elementos da alexina que ainda não foram estudados sob este ponto de vista procedemos do seguinte modo:

Experiencia nº 1—Sôro fresco de cobaya depois de distribuido em tubos foi tratado conforme a technica anteriormente descripta: pelo formol (Sôro formol), pelo hydrosulphito de sodio (Sôro $S^2O^4Na^2$), pela ammonia (Sôro NH^3) e pelo levedo (sôro levedo). Parte d'esse mesmo sôro foi inactivado pelo calor durante meia hora a 56º (Sôro 56º).

A 5 c.c. da emulsão de globulos sensibilizados (obtida juntando a 2,5 c.c. da solução de globulos a 2,5 %, 2,5 c.c. de uma solução de sôro hemolytico contendo em cada 1 c.c. 40 U. H.) addicionou-se 1 c.c. de sôro a 56º. Após contacto a 37º em banho maria por espaço de uma hora os globulos assim tratados, foram centrifugados, 4 vezes lavados em agua physiologica e finalmente emulsionados em 5 c.c. de agua physiologica. Foram então distribuidos por 5 tubos de hemolyse na dóse de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1 addicionou-se 0,1 cc. de Sôro NH^3
Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de Sôro Levedo.
Ao « nº. 3 » 0,1 cc. de Sôro formol.
Ao « nº. 4 « 0,1 cc. de Sôro $S^2O^4Na^2$.
Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de Agua physiologica.

Ao fim de 1 hora em banho maria a 37º foram lidos os seguintes resultados: 1º tubo: hemolyse total [1]; 2º, 3º, 4º e 5º tubos ausencia completa de hemolyse. Verificou-se que qualquer dos sôros nas dóses empregadas na experiencia não dava traços de hemolyse em presença de 1 c.c. de globulos sensibilizados que não tivessem permanecido em contacto com sôro inactivado pelo calor.

Resulta portanto d'esta experiencia que é o componente destruido pela ammonia que primeiro adhere aos globulos sensibilizados pois que o unico sôro capaz de produzir a hemolyse dos globulos sensibilizados postos em presença de sôro inactivado pelo calor é de facto o sôro em que foi destruido esse componente. Como se vê tambem tanto o componente destruido pelo formol como o que foi destruido pelo hydrosulphito não adherem aos globulos sensibilizados como attesta a falta de hemolyse posterior pela addicção de qualquer delles. Que as conclusões que tirámos d'essa experiencia se justificam mostra a seguinte experiencia que é por assim dizer a reciproca da primeira:

Experiencia nº. 2.—A 5 c.c. de globulos previamente sensibilizados como como na experiencia anterior, foi addicionado 1 c.c. de sôro de cobaya tratado pela ammonia (Sôro NH^3). Após uma hora de banho maria a 37º, os globulos foram lavados 4 vezes em agua physiologica, emulsionadas em 5 c.c. d'esse vehiculo e distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1 addicionou-se 0,1 cc. de sôro 56º.
Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de sôro levedo.
Ao » nº. 3 « 0,1 cc. de sôro formol.
Ao « nº. 4 » 0,1 cc. de sôro $S^2O^4Na^2$.
Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: Após uma hora de banho maria a 37º nenhum dos tubos mostrou sequer traços de hemolyse.

[1] Repetindo muitas vezes esta experiencia observámos que nem sempre a hemolyse é total, porém sempre é perfeitamente perceptivel ao fim de 1 hora. Por outro lado nem sempre a inactivação pela ammonia permitte obter sôros completamente inactivados e por isso, para garantia d'esses resultados fizemos muitas vezes esta mesma experiencia addicionando quantidades crescentes de sôro tratado pela ammonia a globulos sensibilizados e a globulos sensibilizados préviamente postos em contacto com soro a 56º e bem lavados. Por comparação com a 1a. serie testemunha os resultados não deixam logar a duvidas.

D'aqui resulta pois que *sem a adhesão prévia aos globulos sensibilizados da fracção sensivel á ammonia, não se dá a adsorpção de nenhuma das outras fracções conhecidas mesmo as labeis e não resta pois nenhuma duvida que é essa fracção a que primeiro adhere aos globulos sensibilizados.*

Experiencia nº. 3.—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como anteriormente addicionou-se 1 c.c. de sôro tratado pelo levedo e depois de permanencia em banho maria a 37º por espaço de uma hora os globulos foram centrifugados, quatro vezes lavados em agua physiologica e finalmente emulsionados em 5 c.c. d'esse mesmo vehiculo. Foram então distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. cada um e a seguir.

Ao tubo nº. 1 addicionou-se 0,1 cc. de sôro amonia.

Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de sôro 56.

Ao « nº 3 « 0,1 cc. de sôro formol.

Ao « nº. 4 « 0,1 cc. de sôro $S^2O^4Na^2$.

Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: Ao fim de uma hora de banho maria a 37º verificou-se hemolyse total no primeiro tubo, hemolyse quasi total no 2º tubo, ausencia completa de hemolyse no terceiro, quarto e quinto tubos.

Esses resultados confirmam pois plenamente os obtidos por Weil e Nathan pois a presença de hemolyse no 2º tubo demonstra que na ausencia do terceiro componente tanto a fracção globulina como a fracção albumina de Ferrata ficaram ligadas aos globulos os quaes então se hemolysam pela simples addição de sôro inactivado pelo calôr.

Como, porém já anteriormente vimos que o terceiro componente não é um elemento simples mas pelo menos composto por sua vez de duas substancias uma destructivel pelo formol e outra destructivel pelo hydrosulphito de sodio procedemos á seguinte experiencia para ver qual d'essas substancias adhere primeiro aos globulos sensibilizados já carregados dos outros elementos da alexina.

Expeeriencia nº. 4—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como precedentemente, addicionou-se 1 c.c. de sôro tratado pelo hydrosulphito. Após meia hora de banho maria a 37º os globulos foram centrifugados, lavados 4 vezes em agua physiologica e emulsionados em 5 c.c. d'esse vehiculo. Finalmente foram distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. por cada tubo e a seguir

Ao tubo nº. 1 addicionou-se 0,1 cc. de sôro NH^3.
Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de sôro 56.
Ao « nº. 3 « 0,1 cc. de sôro levedo.
Ao « nº. 4 « 0,1 cc. de sôro formol.
Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: No 1º tubo hemolyse total; no 2º tubo hemolyse parcial; no 3º tubo ausencia de hemolyse; no 4º tubo hemolyse total; no quinto tubo ausencia completa de hemolyse.

Parece pois que a fracção sensivel ao formol adhere aos globulos carregados da fracção sensivel á ammonia e das fracções termolabeis de Ferrata, antes que se dê a adsorpção da fracção sensivel ao hydrosulphito de sodio. Com effeito a seguinte experiencia que é a reciproca da precedente confirma de modo claro essa conclusão.

Experiencia nº. 5—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como anteriormente foi addicionado 1 c.c. de sôro tratado pelo formol. Após meia hora na estufa a 37º esses globulos foram centrifugados, lavados 4 vezes e emulsionados em 5 c.c. de agua physiologica. A seguir foram distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1 addicionou-se 0,1 cc. de sôro NH^3.
Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de sôro 56.
Ao « nº. 3 « 0,1 cc. de sôro levedo.
Ao « nº. 4 « 0,1 cc. de sôro $S^2O^4Na^2$.
Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de agua physiologica.

Ao fim de mais uma hora a 37º em banho maria foram verificados estes resultados: no 1º tubo e no 2º hemolyse total. No terceiro, quarto e quinto tubos absoluta ausencia de hemolyse.

Fica pois claramente demonstrado com estas duas ultimas experiencias que a fracção sensivel ao hydrosulphito é a ultima a adherir aos globulos e é essa adhesão que finalmente determina a hemolyse.

Procedendo á analyse das condições de permeabilidade osmotica da membrana dos globulos sensibilizados e carregados com todas as fracções da alexina menos a que é sensivel ao hydrosulphito verificamos que collocados em soluções hypotonicas tomam ainda uma fórma globulosa e em soluções hypertonicas (chloreto de sodio a 10 %) tomam um aspecto engilhado caracteristico de bôa permeabilidade a agua. Bem sabemos (Bordet) que tal não acontece depois da hemolyse completa.

Resumindo: Os differentes elementos de que se compõe a alexina adherem aos globulos sensibilizados na seguinte ordem:

Globulos sensibliizados—Fracção sensivel á ammonia (termoresistente) — Fracção globulina (termolabil) — Fracção albumina (termolabil) — Fracção sensivel ao formol (termoresistente) e fracção sensivel ao hydrosulphito (termoresistente).

Até ao momento de adherir esta ultima fracção a membrana

Os Componentes da Alexina na Reacção de Bordet Wassermann — Já mencionámos acima que segundo Skwirsky nas reacções de Bordet e Gengou, positivas tanto na reacção de Wassermann como em outras em que se encontram presentes antigeno e anticorpo é só a fracção globulina termolabil da alexina que se fixa sobre os complexos especificos emquanto a fracção albumina termolabil permanece livre e activa no liquido. Ora sendo ao tempo de Skwirsky, esses os unicos constituintes conhecidos e admittindo-se hoje com muita probabilidade que a reacção de Wassermann é na essencia uma reacção de precipitação, pareceu-nos conveniente verificar que parte tomam no phenomeno os constituintes termoresistentes, sobretudo o chamado terceiro componente pois que elle não só em geral acompanha nos processos de separação das fracções termatolabeis a fracção globulina, como tambem se póde admittir adherem de uma fórma por assim dizer electiva a numerosas emulsões colloidaes.

E' bem sabido que a addição de 0,1 c.c. ou 0,2 c.c. de sôro de cobaya inactivado a 56° meia hora a uma mistura de sôro luetico e antigeno syphilitico, impede a fixação do complemento, transformando a reacção positiva em negativa. Se a addição de sôro inactivado pelo calôr é feita depois que o sôro luetico permaneceu em contacto a 37° por espaço de uma hora com o antigeno correspondente não se dá todavia a hemolyse pela addição de systema hemolytico, o que mostra que sendo capaz de impedir a fixação o sôro inactivado a 56° não é capaz de libertar o complemento fixado sobre o complexo especifico. Se ao invez de inactivar o sôro a 56° o inactivamos a 54° durante meia hora, verifica-se então que elle é capaz não só de impedir a fixação mas é tambem capaz de libertal-o do complexo sobre o qual adheriu. E' o que claramente mostra o seguinte protocollo da experiencia:

Sôro syphilitico—fortemente positivo inactivado a 56° 30 minutos.
Antigeno de Kolmer diluido a 1/20, dóse fixadora: 0,3 c.c.
Alexina de cobaya diluida a 1/10 dóses empregadas: 0,3 e 0,5 c.c. correspondendo no systema hemolytico empregado a 2 e 3 unidades complementares proximamente.

Systema hemolytico: globulos de carneiro sensibilizados por 40 unidades hemolysantes de sôro de coelho anti-carneiro (1 c.c. da solução a 2,5 % mais 1 c.c. da diluição apropriada de sôro hemolytico).

QUADRO VI

REACÇÃO

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8
Sôro syphilitico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Antigeno	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,6	—	—
Alexina	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	—
Sôro cobaya 56º	—	—	0,1	0,1	—	—	0,2	—
Agua physiologica	1,2	1,0	0,1	0,9	1,5	1,1	1,5	1,5
Globulos sensibilizados	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	0

H. t. = Hemolyse total.

0 = Ausencia de hemolyse.

Os 5 primeiros elementos conforme o quadro permaneceram uma hora em banho maria a 37º antes de se lhes juntar o 6º constituido por globulos sensibilizados. A leitura da hemolyse foi feita com mais meia hora de estagio a 37º.

A acção impediente sobre a fixação exercida pelo sôro inactivado a 56º é bem patente.

No quadro VII tanto o sôro de cobaya inactivado a 56º e 54º como as fracções termolabeis da alexina foram addicionadas depois que a mistura de sôro syphilitico e antigeno tinha permanecido por espaço de uma hora a 37º em contacto com as dóses empregadas de alexina.

Vê-se assim que o sôro a 56º é incapaz de libertar a alexina fixada na reacção ao passo que isso fazem não só o sôro inactivado a 54º como qualquer das fracções termolabeis da alexina. Convem todavia assignalar que a addição da fracção globulina produz mais rapidamente a hemolyse do que a addição da fracção albumina, mas o certo é que após a fixação do complemento na reacção de Wassermann fortemente positiva, parece permanecer livre no liquido não só a fracção globulina como a fracção albumina. No sôro aquecido a 54º meia hora, em geral existem tambem activas embora em pequena quantidade, as fracções termolabeis conforme se póde vêr do quadro VIII:

QUADRO VII

REACÇÃO

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro syphilitico.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigeno	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alexina.	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5
Sôro cobaya 56º.	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
Sôro cobaya 54º.	—	—	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—
Fracção Globulina.	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	—	—
Fracção Albumina.	—	—	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.
Agua physiologica.	1,2	1,0	1,1	0,9	1,1	0,9	0,2	—	0,2	—
Glob. sensibilizados	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

QUADRO VIII

TUBOS	1	2	3	4	5
Sôro cobaya 54º.	0,1	0,1	0,4	—	—
Fracção globulina.	1 cc.	—	—	2 cc.	—
Fracção albumina.	—	1 cc.	—	—	2 cc.
Agua physiologica.	0,9	0,9	1,6	—	—
Globulos sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	h. t.	h. t.	0	0	0

Estes resultados parecem tornar plausivel a existencia de um componente destructivel pela temperatura de 56º mas differente dos componentes termolabeis de Ferrata, e que a nosso ver lembram o constituinte assignalado por Bruinoghe na inactivação da alexina pela agua distillada.

Parece-nos todavia arriscado tirar qualquer conclusão d'estes resultados em 1º logar porque contendo o sôro a 54º as fracções labeis de Ferrata só parcialmente inactivadas a sua addição a uma reacção positiva póde dar em resultado uma simples somma de effeitos; em segundo logar sendo o sôro a 56º capaz de impedir a fixação do complemento na reacção de Wassermann não é para desprezar a hypothese de que o sôro a 54º menos alterado pela temperatura tenha maior affinidade para o com-

plemento do que o complexo antigeno-sôro luetico e por isso seja capaz de o deslocar delle. Esta ultima hypothese, aliás, não é a que nos parece menos provavel.

Origem da Alexina.

Deve-se a Nolf o conhecimento da influencia que exerce o figado sobre o teôr em alexina do sôro sanguineo. Ella é de tal ordem que esse autor não hesitou em attribuir ao figado o papel de orgão gerador da alexina. Müller posteriormente poude mostrar que um choque operatorio mais grave que o da extirpação d'esse orgão como o que resulta da evacuação de todos os orgãos abdominaes com excepção do figado não tem a mesma acção sobre a alexina, mas que se conjunctamente se retira o figado pouco tempo depois o teôr da alexina baixa sensivelmente, demonstrrando assim que não são os productos do intestino que passando directamente para a circulação se tornam os responsaveis pela quéda em complemento do sôro. Segundo Müller póde-se mesmo demonstrar a formação da alexina em figados isolados do animal e mantidos vivos por meio de uma circulação artificial. Friedberger e Seelig trabalhando em rãs verificaram que o poder hemolytico d'esses animaes baixa fortemente depois da hepatectomia.

Dick, em 1911, em excellente trabalho demonstrou que em 11 cães de que se havia extirpado o pancreas embora apresentassem todos grande quantidade de assucar na urina e em 6 se tivesse demonstrado acidose intensa, tendo morrido entre alguns dias e duas semanas depois da intervenção, em nenhum observou diminuição da alexina do sôro. A retirada do pancreas e duodeno assim como tambem a retirada simultanea do pancreas e baço não produziram alteração do teôr em alexina. O mesmo acontece pela extirpação das capsulas supra-renaes, intestino delgado, estomago, thiroide ou rins. Em vista da difficuldade de executar a hepatectomia, Dick procurou eliminar a funcção hepatica por meio de venenos para o figado. Usou para isso quer o chloroformio quer o sulphato de hidrazina. Tanto com um como com o outro destes venenos observou constantemeente nos animaes submettidos á experiencia, uma forte quéda na actividade alexica do sôro e concluiu d'ahi que ou a alexina é formada no figado ou da actividade do figado depende a sua presença no sangue. Na intoxicação experimental pelo phosphoro desde 1900 Ehrlich e Morgenroth, tinham observado em cobayas a desapparição completa do complemento.

Com excepção de Liefmann que não observou diminuição do poder hemolytico de rãs de que havia extirpado o figado todos os autores que abordaram este estudo estão de accôrdo com a forte influencia que exerce o figado na regulação da alexina do sôro. Abrindo outra excepção, Ro-

senthal, recentemente fazendo a extirpação do figado em cães pelo processo de Mann e Magath, chegou á conclusão de que o complemento não se forma n'esse orgão porque o teôr da alexina só baixa no sôro 11 horas após a extirpação d'essa viscera. Segundo o mesmo autor, coisa curiosa, o fibrinogenio tambem só baixa no sangue circulante justamente 11 horas após a retirada do figado. Como Rosenthal não se manifesta a respeito, é de crer que não considere possivel a origem hepatica do fibrinogenio, hoje em dia admittida por todos os autores que mais recentemente se occuparam com este estudo e que segundo Wöhlich se póde considerar como provado.

A questão mais difficil de resolver tanto nas relações do figado com alexina como nas suas relações com o fibrinogenio é saber se essa glandula é de facto o orgão de origem d'essas substancias, ou apenas o regulador da taxa d'ellas no sôro. No caso da alexina, sendo como vimos esse corpo um complexo de 5 elementos differentes pelo menos haveria primeiro que elucidar se alguns ou todos elles são ou não influenciados pelo figado. N'esse sentido fizemos algumas experiencias em cães a exemplo de Dick já com sulphato de hydrazina já com chloroformio. As experiencias com hydrazina tendo nos dado baixas menos accentuadas da alexina do que o envenenamento pelo chloroformio foi com este ultimo corpo que executámos experiencias mais minuciosas pelas quaes se verifica que a intoxicação do figado produz uma baixa não só da alexina considerada globalmente, mas de cada um dos elementos em que actualmente póde ser desdobrada com excepção talvez da fracção globulina de Ferrata.

QUADRO IX

Dosagens da Alexina e dos seus Componentes

	Antes da chloroformização	40 horas após a chloroformização
Alexina	0,08 cc. h. t. 0,04 cc. 0	0,3 cc. h. t. 0,2 cc. 0
Alexina—0,1 sôro 56°	0,04 cc. h. t. 0,02 cc. 0	0,2 cc. 0
Alexina—0,1 sôro NH^3	0,02 cc. h. t. 0,01 cc. 0	0,2 cc. h. t. 0,1 cc. 0
Alexina – 0,1 sôro formol.	0,04 cc. h. t. 0,02 cc. 0	0,2 cc. 0
Alexina—0,1 soro $S^2O^4Na^2$	0,002 cc. h. t. 0,001 cc. 0	0,04 cc. h. t. 0,01 cc. 0
Alexina—Fr. albumina.	0,04 cc. h. t. 0,02 cc. 0	0,06 cc. h. t. 0,04 cc. h. q. t.
Alexina—Fr. globulina.	0,02 cc. h. t. 0,01 cc. 0	0,15 h. t. 0,1 cc. h. q. t. 0,08 cc. 0

h. t. = Hemolyse total.

h. q. t. = Hemolyse quase total.

0 = Ausencia de hemolyse.

Eis o protocollo de uma das nossas experiencias procedidas em cães.

Cão pesando 12 kilos foi chloroformizado e mantido em narcose profunda profunda por espaço de 2 horas e 20 minutos, no que se gastaram cerca de 100

c.c. de chloroformio. Na tabella a seguir encontram-se as dosagens procedidas no sangue d'esse animal antes e 10 horas após a chloroformização. Nas dosagens a hemolyse foi sempre feita como anteriormente, isto é: solução de globulos de carneiro lavados a 2,5 % sensibilizados por 40 u. h. e a reacção executada no volume total de 4 c.c. de liquido.

Como claramente se vê todos os componentes da alexina soffreram sensivel reducção. A alexina total apresentou um valor approximadamente 5 vezes menor que o do teôr primitivo. Tanto o componente sensivel á ammonia como o sensivel ao formol e ao hydrosulphito apresentaram um decrescimo ainda maior, cerca de dez a vinte vezes menos do que no sangue do animal são. A fracção albumina termolabil da alexina reduziu-se a cerca de 1/5 do valor primitivo e só a fracção globulina cahiu de modo insignificante dando hemolyse quasi total na dose em que antes da chloroformização dava hemolyse total: 0,04 c.c. Estes resultados mostram que a quéda do valor da alexina dosada globalmente é devida principalmente á falta dos componentes contidos na fracção albumina termolabil e confirmam tanto os resultados de Dick na intoxicação de cães com chloroformio, como os que um de nós (C. C.) encontrou na febre amarella, e pelos quaes esses autores foram levados a crer que o figado devia ser responsabilizado pela producção d'essa fracção. Todavia todas as outras fracções, com excepção talvez da fracção labil globulinica, se mostram dependentes da maior ou menor actividade hepatica.

A questão de saber se o figado é um simples regulador da alexina do sôro ou o seu orgão gerador parece-nos destituida de interesse, uma vez que a retirada de qualquer outro orgão que não seja o figado nenhuma acção exerce sobre o teôr da alexina do sangue. N'este sentido, approveitando a opportunidade que se nos offereceu, tivemos occasião, graças ao obsequio do Dr. M. Osorio de Almeida, de acompanhar durante 4 a 5 horas o teôr alexico de tres cães submettidos á descerebração sem observar a mais leve diminuição da alexina embora em alguns a temperatura tivesse subido a 45° por exposição propositada aos raios solares.

Nos cães que submettemos á chloroformização observámos além d'isso que a quéda do teôr em alexina é visivelmente proporcional á quantidade de coagulo formado pela mesma quantidade de sangue extrahido. Ora as irregularidades que se observam na coagulação do sangue dos cães n'essas condições corre por conta sobretudo, se não exclusivamente, de uma baixa no teôr do fibrinogenio circulante (Whipple e Hurwitz). O parallelismo entre a quéda do fibrinogenio e a quéda do complemento nas intoxicações do figado resulta já dos resultados a que chegaram Whipple e Hurwitz quanto ao fibrinogenio e os de Dick quanto á alexina; os pri-

meiros concluem que essa diminuição é proporcional ao gráo de necrose do figado, conclusão a que tambem chega o segundo quanto á quéda do complemento. E' tão evidente esse parallelismo na intoxicação chloroformica que resolvemos instituir dosagens de fibrinogenio nos nossos animaes em experiencia no sangue da mesma sangria que nos fornecia material para dosagem da alexina. As dosagens de fibrinogenio foram executadas pelo methodo de Chandler graças á preciosa collaboração do nosso collega Dr. G. Villela com o qual viremos futuramente a publico mais pormenorizadamente sobre este assumpto. Damos a seguir o protocollo de um animal neste sentido examinado:

Cão pesando 8 kilos foi submettido á chloroformização e mantido em narcose profunda durante 2 horas e 10 minutos tendo-se gasto nesse espaço de tempo cerca de 90 c.c. de chloroformio.

QUADRO X

Dosagem fibrinogenio		Dosagem alexina
Antes da chloroformização	0,42 o/o	0,08 cc. h. t.
45 horas depois da chloroformização	0,15 o/o	entre 0,30 e 0,2 cc. h. t.
68 « « « «	0,17 o/o	0,22 cc. h. t.
90 « « « «	0,21 o/o	0,17 cc. h. t.
160 « « « «	0,41 o/o	0,085 cc. h. t.

A correspondencia de valores é de tal ordem que como é facil de verificar se as dosagens de complemento são feitas com sufficiente rigôr, se póde calcular por ellas o teôr em fibrinogenio n'esses animaes por uma simples proporção inversa.

A verdade é que se esse parallelismo tão estreito não é sufficiente para demonstrar que fibrinogenio e alexina são produzidos no mesmo orgão, não é menos verdade que todas as razões que prevalecem para levar a accôrdo a maioria dos autores no que diz respeito á origem hepatica do fibrinogenio são as mesmas bôas razões que militam pelo accôrdo ainda não completo sobre origem hepatica da alexina.

SUMMARIO

1º. Os autores observam que após a inactivação de sôro de cobaya a 54º durante 30 minutos permanecem no sôro as fracções thermolabeis em quantidade apreciavel; um tal sôro conservado na temperatura de 6º, por espaço de 18 horas, regenera parte da sua actividade alexica perdida.

2º Confirma-se a existencia de 4 componentes do complemento.

3º O chamado terceiro componente de Ritz e Coca é na verdade constituidos por dois elementos, pelo menos, differentes: um destructivel pelo formol e outro destructivel pelo hydrosulphito de sodio.

4º A ammonia, o formol e o hydrosulphito de sodio são capazes de destruir os constituintes thermoresistentes da alexina do sôro inactivado a 56º 30 minutos, ao passo que as emulsões de levedos, de orgãos ou de gelose não o são.

5º As emulsões de levedo addicionadas a uma mistura em partes eguaes de sôro fresco de cobaya e de sôro aquecido a 56º, 30 m., são capazes de retirar não só o terceiro componente contido no sôro fresco da mistura, mas tambem o terceiro componente contido no sôro inactivado pelo calor.

6º Sem excluir a hypothese de uma floculação em que o sôro aquecido exerça o papel de um colloide protector, os autores admittem que a inactivação do complemento pelas emulsões de levedo ou pela gelose seja devida a substancias thermolabeis, do sôro, depois de adsorpção por essas emulsões, de substancias anti-tripticas.

7º Os diversos elementos que constituem a alexina são adsorvidos pelos globulos sensibilizados na seguinte ordem: Globulos-sensibilizadora—Fracção thermo-resistente sensivel á ammonia—Fracção thermolabil Globulina-Fracção thermolabil albumina—Fracção thermoresistente sensivel ao formol-Fracção thermoresistente sensivel ao hydrosulphito de sodio.

8º Na reacção de Bordet-Wassermann fortemente positiva é fixada sobretudo a fracção globulina thermolabil do complemento e não sómente o terceiro componente como seria licito esperar; a fracção thermolabil albumina permanece de regra livre e activa no liquido.

9º Os autores acham que se deve considerar como demonstrada a origem hepatica da alexina. Segundo experiencias procedidas em cães intoxicados pelo chloroformio não só baixa consideravelmente o titulo alexico global do sôro mas tambem os titulos, de todos os constituintes da alexina separadamente, soffrem, com excepção da fracção thermolabil globulina, uma reducção muito accentuada.

BIBLIOGRAPHIA

BORDET, J.—C. Rend. de la Soc. de Biol. 1913, vol. 74 pag. 225 e pag. 877.

BORDET, J.—Traité de l'Immunité dans les maladies Infectieuses, 1920, pag. 610.

BRAUN, H.—Bioch. Zeitschr. 1911, vol. 31 pag. 65.

BROWNING e MACKIE—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914, vol. 21, pag. 422.

BUCHNER, H.—Centralblatt f. Bakt. 1889, vol. 5. pag. 817.

BUCHNER, H.—Centralblatt f. Bakt. 1889, vol. 6, pag. 1 e 561.

BUCHNER, H.—Munch. Med. Wochenschr. 1891. 38 Yahrg. pag. 656. Internationaler Congress f. Hyg. und Demographie. Skt. f. Bakteriologie.

COCA, ARTHUR F.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914, vol. 21, pag. 604.

DICK, GEORGE F.—The Journ. of Infectious Diseases, 1913 vol. 12, pag. 111.

GORDON, J. WHITEHEAD, H. R. e WORMALL, A.—Biochemical Journ. 1926. vol. 20 pag. 1028.

MICHAELIS, L. e SKWIRSK, P.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1910, vol. 4 pags. 357 e 629.

NATHAN, ERNST—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914 vol. 21, pag. 259.

NATHAN, E.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1917, vol. 26 pag. 503.

NUTTALL, GEO.—Zeitschr. für Hyg. und Infektionskrankh. 1888, vol. 4, pag. 353.

OMOROKOW, L.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1911, Orig. vol. 10, pag. 285.

RITZ, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1911, vol. 9, pag. 321.

RITZ, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1912 vol. 13 pag. 62.

RITZ, H. e SACHS, H.—Centralblatt f. Bakt. Ref. 1911, vol. 50 pag. 43.

RITZ, H. e SACHS, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1917, vol. 26 pag. 483.

ROSENTHAL, F.—Ergebn. der Inn. Med. und Kinderheilk, 1928, vol. 33 pag. 139.

SKWIRSKY, P.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1910 vol. 5, pag. 538.

WHIPPLE, G. H. e HURWITZ, S. H.—The Journ. of Exp. Med. 1911, vol. 13 pag. 136.

WHITEHEAD, H. R., GORDON, J. e WORMALL, A.—The Biochemical Journ. 1925, vol. 19, pag. 618.

WÖHLISCH—Ergebn. der Phys. Iahrg. 28, 1929 pag. 582.

Constitution of alexin and mechanism of specific haemolysis (*)

by

J. DA COSTA CRUZ, M. D., and H. DE AZEVEDO PENNA, M. D.

In 1888, in a memorable work, subjecting the theory of phagocytosis to a close analysis, Nuttall discovered the bactericidal power of blood. From the first, he verified that all warm-blooded animals examined, such as: man, dog, sheep, rabbit, etc., except mouse (the lack of alexic activity in this animal is due, as shown by Ritz, to the action of anti-complementary substances), exhibit this property with a great constancy towards various microscopical organisms and that this property is still exaggerated when the blood proceeds from animals previously subjected to immunization. According to Nuttall, phagocytosis would occur only when the bacteria are either dead or sufficiently attenuated by the action of the bactericidal properties of the fluid part of the blood, thus establishing the foundations of the study which Wright, only twenty years later on, carried out with regard to opsonins. Nuttall, also from the first, verified that the bactericidal property is being consumed during the bactericidal action and that it, therefore, is partially proportional to the quantity of bacteria placed in presence of blood. On the other hand, he stated that this property is very instable, quickly disappearing when the blood is preserved at room temperature or when it is heated at 55° C. for half an hour, thus being, led to believe this property was due to the action of an enzyme.

The following year, Buchner confirmed all the results obtained by Nuttall and in 1890, subjecting the sera to dialysis, he was able to affirm that the bactericidal property is an attribute of an albuminoid substance which, in order to exert its activity, requires a special physical condition, that is a particular arrangement of the albuminoid molecules within the larger groups of the micellas. In 1891, Buchner gave to this substance the name of alexin. The studies on alexin made little progress until 1894, when, consecutive to the discovery of Pfeiffer's phenomenon, they received a new impetus. Amongst the intense researches then carried out in this respect, Bordet's works stand out in bold relief. This author proved, in

(*) Received for publication, November, 23st. 1931.

a through manner, that the bactericidal action is a result of the simultaneous activity of two different substances, one of them being specific, relatively heat stable which he called sensitizer, and the other, a non-specific one, which corresponds to Buchner's alexin, on account of its thermolabile properties. At the same time, Bordet verified that the lytic property of alexin is not confined to the action upon beings with autonomous life, but even to extend the action upon cellular elements of superior organisms, such as the red blood cells. By proving that haemolysis produced by sera obey the same rules governing bacteriolysis and thanks to the simplification of the technique, he rendered feasible the analysis of the problem to be brought to a degree, which then was very far from being reached. From this analysis a controversy arose between Bordet and Ehrlich with their collaborators and a very curious statement resulted therefrom that the thermostable and specific substance of sera can adhere to bacteria or to erythrocytes when alexin is lacking, and that without this adhesion, alexin does not exert any haemolytic or bacteriolytic action. For some years, the works concerning this matter did not change the notions on the constitution of alexin theretofore prevailing.

In 1907, unexpectedly, Ferrata resuming Buchner's studies cited above concerning the action of dialysis on alexin, verified that this substance is not a specific one, but it is. really, constituted by two elements, one of them precipitating in distilled water, whilst the other remains soluble. Separately, neither of them can determine haemolysis of sensitized blood cells, yet inducing it quickly if added, at the same time, to blood corpuscles and sensitizer. These interesting results were promptly confirmed by numerous researches and the processes of separation of both these elements having been improved. Brand, still in the same year, not only shows that both substances are thermolabile as alexin itself, but also that the portion precipitated by distilled water, the globulin portion, after being redissolved in saline solution adheres directly to the sensitized blood cells (midpiece) and that without this adhesion the fraction soluble in distilled water (endpiece) cannot exert any activity, the latter therefore behaving towards the former as alexin towards the sensitizer.

Michaelis and Skwirsky verify that, if the concentration of H-ions is (H') 3, 8.10^{-6}, the globulin fraction adheres to the sensitized blood cells and may then be heated at 56°C., without losing its activity, the albumin fraction still remaining free in the liquid, and haemolysis, consequently, not taking place. The blood cells thus loaded with sensitizer and midpiece were called by Michaelis *persensitized* blood cells. Soon afterwards, Skwirsky brings forward that in the majority of Bordet and Gengou's reactions

(Wassermann's reaction, that of tuberculous serum and tuberculin, that of precipitant serum and homologous precipitinogen), the portion of alexin corresponding to the albumin fraction remains free in the liquid and that the lack of haemolysis of the haemolytic system is exclusively due to the lack of the globulin fraction. The necessity of collaboration of two substances in order that the alexic property may be revealed was thus established by means of the most varied techniques, and since then the study of the properties of alexin takes into consideration the complexity of this agent.

Reasuming, in 1912, the study of the inactivating property of cobra venom upon alexin, Ritz is led to admit, apart from the two fractions discovereed by Ferrata, one more; this latter, relatively thermostable, is indispensable in order that the alexic activity may be exerted. In fact, in sera thus inactivated the regeneration of alexin is easily obtained by mere addition of guinea pig serum inactivated by heat, wherefrom one must forcibly infer that Ferrata's components exist there in the necessary quantity. Liefmann, contrasting this point-of-view, deemed rather expedient, on account of the complexity of cobra venom, that the mixing of the latter with fresh serum might change the medium so as to render it improper for the process of haemolysis. From the addition of inactivated serum might result a partial or entire recomposition of the original conditions. Noguchi and Bronfenbrenner already considered, in like manner, the dissociation of Ferrata's thermolabile fractions. These authors believed that the alexic activity is due exclusively to the albumin fraction, and that the globulin fraction, thanks to its amphoteric character, only confers on the medium the reaction conditions which are indispensable for the realization of the process. In 1914, Coca proved that Ritz is right when he affirms the existence of a thermostable component of alexin. On studying the antialexic action exerted by emulsions of yeasts and organs which had been observed by V. Dungern, since 1901, he succeeded in verifying that the sera inactivated by these means are like those inactivated by cobra venom, able to reacquire their original activity through the addition of serum inactivated by heat. Owing to this new method of examination, Liefmann's objection disappears because it is difficult to find out another interpretation in order to account for the influence of the yeast emulsions, if not based on a process of adsorption. Still in the same year, Ritz and Sachs observed that this third component can also be removed from fresh sera by bacterial emulsions, especially by *B. prodigiosus*. Omorokow, Sachs and Omorokow emphasize the importance of the concentration of serum for its inactivation by means of cobra venom and bacterial emulsions. Still in this same year, Nathan confirms the results obtained by

Weil in the preceding year, according to which sensitized blood cells placed into contact with guinea pig serum inactivated by cobra venom or by bacterial emulsions are loaded with the globulin fraction as well as with the albumin fraction of Ferrata, and the blood cells in such conditions are called by him *hypersensitized*.

In 1917, Ritz and Sachs, on studying the mechanism of inactivation of alexin by means of bacterial emulsions, consider it as approximating to the formation of anaphylatoxin *in vitro*. On the same occasion, Nathan states that cobra venom as well as bacterial emulsions cannot remove from the serum inactivated by heat the third component which exists there in a state of activity. In 1930, Cruz and Penna not only confirmed this latter result of Nathan, and also stated that under certain conditions formaldehyde removes the third component from fresh sera as well as from those which previously have been inactivated by heat at 55°C., during half an hour.

The existence of the third component thus being established, the complexity of alexin did not yet stop there, because, in 1926, Gordon, Whitehead and Wormall, on studying the action of proteolytic enzymes upon alexin, had the opportunity of verifying that it can be inactivated by small quantities of ammonia and that this inactivation is not due to the destruction of the third component nor of Ferrata's thermolabile fractions, but to another heat stable substance which they called fourth component.

For the present, it must, therefore, be admitted that alexin is really constituted by four elements: one thermolable which exhibits all the physico-chemical properties of globulins; another one, also thermolable which exhibits the properties of albumins (pseudo-globulins), and two others, heat stable, the so-called third component which can be removed from fresh sera through the action of formol or of cobra venom, bacterial emulsions, emulsions of organs or of yeasts, usually, as a matter of fact, based on an action of adsorption, and finally a fourth component, also heat stable, which disappears from fresh sera or from inactivated sera on addition of small quantities of ammonia.

Thermostable comoponents. When we study the factors which exert some damaging action whatever upon the alexic power, the great, or rather the greatest, difficulty consists in knowing whether this action directly affects the alexin or the extremely complex medium upon which it exerts its activity. In some cases it is seen that this latter hypothesis is easily demonstable; thus, beyond certain limits of pH, both for the alkaline zone as for the acid zone, the specific haemolysis is inhibited, nevertheless, this inhibition ceases if the reaction is adjusted again to a pH

which is in the neighbourhood of neutrality; in hypertonic solutions of neutral salts, as sodium chloride itself, haemolysis does not take place also, but it suffices to reduce the contents of salt in the liquid by dilutions in distilled water or by dialysis in order to see the alexic activity reappear, when the isotonia is attained. In other cases the doubt is more difficult to be cleared up, for instance, when it happens with the simple inactivation by heat.

In fact, when fresh guinea pig serum is heated in water bath for the lapse of half an hour at 54°C. (temperature rigorously controlled), one verifies that at the dose of 0.5 c.c. placed into presence of blood cells sensitized by 40 haemolytic units during half an hour at 37°C., there is no trace of haemolysis. But if Ferrata's globulin fraction or albumin fraction is added at the dose of 0.1 c. c. (perfect separation, neither of them separately exhibiting any traces of haemolysis at the dose of 0.2 c.c.), 0.1 c.c. of the serum heated at 54°C. exhibits a quick and complete haemolysis. It is therefore evident that the inactivation of alexin at such a temperature is not dependent exclusively upon a destruction of any one of these two elements. A fact still more curious is that such a serum being left during the lapse of 18 to 20 hours at the temperature of 5° to 6°C., it partially reacquires its haemolytic activity, giving a complete haemolysis with the same emulsion of blood cells employed above, even at the dose of 0.2 c.c. during half an hour in water bath. On the other hand, the fresh serum left at the same temperature of 6°C. during the same lapse of time, does not exhibit any increase of the alexic title, as we rigorously verified. It therefore seems to be evident that the inactivation is dependent upon the destruction of another thermolable fraction not yet known, or upon a change of the physical conditions of the medium, to a certain degree reversible; this latter hypothesis is not the least plausible. In view of this, one may put the question, whether the inactivation at 55° or 56°C. does not change the medium in the same manner, though with greater intensity and in irreversible manner. Nevertheless, all the authors believe that this is not the case, because the serum thus inactivated in most instances does not exhibit any valuable anticomplementary action, and on the other hand it induces no haemolysis after separate addition of the labile fractions. In our opinion, whether the inactivation of sera is dependent upon a change of the medium or upon the destruction of one of the constituents of alexin is a difficult, but not an impossible problem to be solved, in some cases atl east as we shall see later on.

We also must take care to establish clearly what is meant by alexin. This substance can be revealed in fresh sera by its lytic (bactericidal),

properties, by opsonizant properties and by conglutinant properties. Yet, either the opsonizant properties (Gordon, Whitehead, Wormall) or the conglutinant properties (Bordet) may be present in sera unable to induce haemolysis owing to lack of one of the fractions of alexin. When we are speaking here of alexin, we mean to express by this word the integral capability of freesh sera to induce haemolysis in presence of sensitized blood cells.

The technique we employed in these researches has already been described in a previous paper, and we have no additional remarks to make. The reactions of haemolysis were always performed in 4 c.c. of fluid. In every test tube we always used 1 c.c. of a 2.5 % solution of washed sheep blood cells mixed up with 1 c.c. of haemolytic anti-sheep rabbit serum, containing 40 haemolysing units and corresponding to a dilution of 1/210 of the haemolytic rabbit serum inactivated at 56°C. during 30 minutes. The complement fractions were obtained as follows: The thermolabile ones by Liefmann's method slightly modified: dilution at 1/10 of fresh guinea pig serum in iced distilled water, passage through carbonic anhydride during the lapse of 13 minutes, centrifugation and washing of the deposit in iced distilled water saturated by carbonic anhydride; reconstitution of isotonia and of pH. The heat stable fractions were obtained as follows: The third component by adsorption from emulsions of yeasts (Fleischmann's yeasts), which remained in contact with fresh serum at 37°C. for the lapse of 2 hours; the fraction which corresponds to the fourth component was obtained in accordance with the technique of Gordon, Whitehead and Wormall, to each 2 c.c. of fresh serum being added 0.5 c.c. of a solution of ammonia at n/6.5, leaving them in contact in water bath at 37°C. for the lapse of an hour and a half, and finally neutralizing it with hydrochloric acid at n/5 so as to restore the anterior pH, that is by adding about 0.37 c.c. In order to remove the third component by means of formol, to each 2 c.c. of fresh guinea pig serum we added 0.2 c.c. of a solution of formalin at 1/100 recently prepared, and the mixture was left in water bath at 37° C. for the lapse of one hour.

The mechanism of action of formol upon alexin from guinea pig serum. As already stated in our previous paper, we emphasized that only exceptionally sera inactivated by formalin can reactivate the serum inactivated by yeast emulsions. The numerous experiments we carried out, up to the present date, lead us to identify in a sure manner the component inactivated by formalin with the third component of Ritz and Coca. The mechanism of this inactivation might be attributed to an adsorption of the serum physically altered by the formol, when the well known gelifying

action of this substance is taken into consideration. This action would thus be similar to that exerted by emulsions of yeasts, bacteria, organs, etc. But in reality it is not so. As we already remarked in our previous paper, there is a fundamental difference between the action of formol and that of these colloids. Whilst the latters are powerless to remove the third component from guinea pig serum inactivated by heat, formol on the contrary removes the third component from this serum as well as from fresh serum. The action of formol may, perhaps, be attributed to a process of oxydo-reduction similar to that which occurs in fresh milk, in Shardinger's reaction. Just as in this latter case, formol acts only in a neutral or rather in a slightly alkaline medium, as is to be seen from the following experiment:

In each of three test-tubes for agglutination, 2 c.c. of fresh guinea pig serum are placed. After addition of one drop of n/1 hydrochloric acid to the first, of one drop of saline solution to the second and of two drops of n/1 sodium hydroxide to the third. To each of the three 0.2 c.c. of a solution of formalin at 1/100 are added. After having been placed in water bath at 37°C. for half an hour, their alexic contents were dosed on blood cells strongly sensitized.

Having repeated the experiment by addition of 0.2 c.c. of a formalin solution at 1/10 to each tube, we obtained the following results:

Serum formol 1 % alkaline — alexic activity 0.5, absence of haemolysis
Serum formol 1 % neutral — alexic activity 0.5, absence of haemolysis
Serum formol 1 % acid — alexic activity 0.1, complete haemolysis

As we verified, in the second and third tubes not only the third component, but also the two thermolable constituents of alexin were destroyed.

Here it is of opportunity to remark that just as occurs with the inactivation by formol of the third component of alexin, if Shardingers reaction is performed in fresh milk heated at 56°C., during half an hour, the results of reduction of methylene blue by addition of formalin do not occur when the reaction of the medium or the concentration of formol are varied.

Experiment nº. 1—In a series of test tubes for agglutination, 2 c.c. of fresh milk were placed with the addition of 0.2 c.c. of formol at 1/10 to the first tube, 0.2 c.c. of formol at 1/100 to the second, 0.2 c.c. of formol at 1/1000 to the third and 0.2 c.c. of formol at 1/10.000 to the fourth.

TABLE I

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Serum at 56oC.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.2
Serum-formol 1/1000 acid.	0.2	0.1	0,06	0.03	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Serum-formol 1/1000 neutral.	—	—	—	—	—	0.2	0.1	0.06	0.03	0.02	—	—	—	0.2	—	—
Fresh-serum 1/1000 alkaline.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4	0.2	0.1	—	0.1	—
Saline solution.	1.8	1.9	1.94	1.97	1.98	1.8	1.90	1.94	1.97	1.98	1.60	1.8	1.9	1.87	1.8	1.8
Sensitized blood cells.	2 cc.	2. cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	p. h.	0	0	0	0	0	0	0	t. h.	t. h.	0

t. h. = Complete haemolysis.

p. h. = partial haemolysis.

0 = Lack of haemolysis.

An identical series was ranged with fresh milk heated during half an hour at 56°C. at all the tubes were added three drops of methylene blue at 1 %.

Reading after 10 minutes at 40°C.: Decoloration in the 2nd tubes of each series. In the others there was no change. At the end of half an hour, the aspect was the same, with only a shade of difference as to the 1st tubes, where a slight change of tonality of the methylene blue was observed.

Experiment nº. II—A certain quantity of fresh milk was distributed into three test tubes, 10 c.c. in each. To the first tube 0.2 c.c. of n/1 hydrochloric acid weere added so as to exhibit a plain acid reaction to litmus; to the third 0.2 c.c. of n/1 soda were added so as to obtain a sharp alkaline reaction to litmus; the milk of the second tube, to which was added 0.2 c.c. of saline, showed neutral reaction to litmus.

These three samples of fresh milk were divided, each of them, among a series of tubes for haemolysis at the dose of 2 c.c., to which afterwards there were added three drops of methylene blue at 1 % and various quantities of formaline that is: 0.2 c.c. of a solution at 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000. The tubes being placed at 40°C., after 5 minutes, a complete descoloration of the dye was observed in the tube containing the formaline dilution at 1/1000 in the series of alkalinized milk. At the end of 20 minutes, decoloration of the corresponding tube of the series of the neutral milk was observed. After two hours, none of the tubes of the acid series traces of decoloration.

It is not, therefore, devoid of singularity that the action of formol upon the third component of alexin is exerted not only within the optimum concentration for Shardinger's reaction, but also within the very same limits of reaction of the medium. Though decoloration of the methylene blue is not obtained by addition of formol to fresh serum, we are inclined to believe that the action of this substance upon the third component might be exerted, as in Shardinger's reaction, in an indirect way.

In view of these results we deemed reasonable the study of the action of other more energetic reducers upon alexin.

The action of sodium hydrosulphite upon guinea pig alexin.

Whilst performing researches in this respect, during the study of the action of sodium hydrosulphite upon fresh guinea pig serum, we met with interesting results. After some trials, we verified that this body exerts an inactivating action upon the complement, without altering at all the labile components of alexin, when mixed with serum so as to

TABLE II

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fresh serum.	–	—	—	—	—	—	—	–	—	–
Serum + $S^2O^4Na^2$.	0.2	0.15	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01	0,2	0,15
Serum at 56°C.	—	—	—	–	—	–	—	—	0.1	0,1
Saline solution.	1.8	1.85	1.9	1.92	1.94	1.96	1.98	1.99	1.9	1.75
Sensitized red blood cells.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results	0	0	0	0	0	0	0	0	t. h.	t. h.

0 = Lack of haemolysis
t. h. = Total haemolysis.

TABLE III

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serum + NH^3	0.2	—	—	–	–	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.
Serum + Yeast.	—	0.2	—	—	—	–	0,1	—	—	–	—
Serum + Gelose.	–	—	0.1	—	—	—	—	0.05	–	—	—
Serum + Formol.	—	—	—	0.2	—	–	—	—	0.1	–	—
Serum + $S^2O^4Na^2$.	—	–	–	—	0.2	–	–	—	—	0.1	–
Serum at 56°C.	—	—	–	—	—	0.2	—	–	–	—	0.
Saline solution.	1.8	1.8	1.9	1.8	1.8	1.8	1.8	1.85	1.8	1.8	1.
Sensitized blood cells	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 c
Results after 1/2 hour at 37°.	0	0	0	0	0	0	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t.

t. h. = Total haemolysis.
p. h. = Partial haemolysis.
0 = Lack of haemolysis.

1	12	13	14	15	16	17	18	19	20
–	—	—	—	—	—	—	0.04	0.02	0.01
.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01	—	—	—	—
.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	–	–	—
.8	0.82	0.84	0.86	0.88	0.89	1.8	1.96	1.98	1.99
cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	traces	0	t. h.	t. h.	traces

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	–	—	—	—	–	—	—	—	—	—
	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	–	—	—	—
	0 05	—	—	–	0.05	0.05	0.05	—	—	–
	—	0.1	—	—	0.1	—	—	0.1	0,1	—
	–	—	0.1	–	—	0.1	–	0.1	—	0.1
	—	—	—	0.1	--	—	0.1	—	0,1	0.1
	1.85	1.8	1.8	1.8	1.85	1.85	1.85	1.8	0.8	1.8
:	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
.	0	0	p. h.	t. h.	0	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.

form with the latter a solution at 1/100, as may be seen from the following experiment:

To 2 c.c. of fresh guinea pig serum 0.02 grs. of crystallized $S^2O^4Na^2$ (Kahlbaum) are added which rapidly enters into solution by slight shaking. The material is then placed into water bath at 37°C. for half an hour, and at the end of this time the mixture is neutralized by adding one drop of normal soda. The tube containing this serum is afterwards plunged into iced water. The following table shows not only that the inactivation of the third component is complete, but also that there is no decrease, even slight, of the contents of serum in labile fractions.

See table II.

As may be seen, the addition of serum inactivated by heat integrally restores the alexic activity of the serum inactivated by hydrosulphite.

Apart from serum inactivated by heat, serum inactivated by hydrosulphite can be reactivated not only by serum inactivated by ammonia, but also by serum inactivated by formol or by gelose. The reactivation of serum inactivated by yeast either does not take place or only occurs in an incomplete manner, which fact is verified in the majority of cases, as shown in the following table III.

It is therefore evident that hydrosulphite destroys a heat stable component of alexin which differs from that destroyed by formol. Nevertheless both are not completed by the yeast—treated-serum which indicates that both ought to be comprised in that constituent which is called the third component. It is also to be noted that the sera from which the third component has been removed by gelose, do not complete the formol-treated-serum, but do complete, and well, the serum inactivated by hydrosulphite, as shown by tubes nºs. 16 and 17. It is therefore beyond doubt that the so-called third component is constituted by, at least, two different substances, which fact, besides, seems to be confirmed, as we shall see later on, by the study of the adhesion of the alexic components to sensitized blood cells.

The inactivating action of hydrosulphite is exerted on fresh serum as well as on serum inactivated by heat. The same also occurs with ammonia and with formol, being the contrary of what occurs with gelose and with yeast emulsions.

See the following table:

TABLE IV

TUBES	1	2	3	4	5
Serum + $S^2O^4Na^2$.	0.2	—	—	0.1	0.1
Serum at 56°C.	—	0.2	—	0.1	—
Serum at 56° + $S^2O^4Na^2$.	—	—	0.2	—	0.1
Saline solution.	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Sensitized blood cells.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results.	0	0	0	t. h.	0

t. h. = Complete haemolysis.

0 = Lack of haemolysis.

The labile fractions which remain active in sera inactivated either by ammonia, formol or hydrosulphite can easily be separated in distilled water by precipitation through carbonic anhydride. It is then verified that either the globulin fraction or the albumin fraction obtained is powerless to induce haemolysis of sensitized blood cells even when added to serum inactivated by heat. Haemolysis nevertheless takes place if both are used simultaneously in presence of serum inactivated by heat.

Manner of inactivating fresh serum by yeast emulsions.

The mechanism of the inactivation of fresh serum by hydrosulphite takes place, as one may suppose, by means of a direct reduction of a certain substance of serum; that of formol, as already seen, presents many analogies with that of the reduction of methylene blue in fresh milk, in Shardinger's reaction; that of adsorbent substances, yeasts, gelose, etc., etc., as it seems, is not easy to be determined experimentally to a sufficient degree of certainty.

Owing to the fact that these adsorbents do not remove the third component from heat inactivated serum, one might think that thermolabile substances are indispensable for this inactivation. One might plausibly admit that these adsorbents remove from fresh serum not directly the third component, but antifermentative substances, the removal of which from serum might arise, as a consequence, the destruction of the third component by active thermolabile ferments. Such is the interpretation we have already given in our previous paper. In favour of this hypothesis we have not only the fact that the action of these substances, in order to become effective, at times requires a contact, more or less prolonged, with the serum, but also the close relationship which exists between the forma-

tion of anaphylatoxin in these sera and the inactivation of the third component. This hypothesis not prevailing, one must forcibly admit that serum inactivated by heat exerts an inhibitive effect upon the inactivating action of these adsorbents. In the former case, it is evident that these adsorbents added to a mixture of fresh serum and serum heated at 56°C. ought to be able to destroy the third component of the serum inactivated by heat, in the mixture; in the latter hypothesis, one should expect the contrary. We therefore made the following experiment with a view to obtain these results:

Into a tube for haemolysis 1 c.c. of fresh guinea pig serum was placed and afterwards 1 c.c. more of the same serum inactivated by heat in water bath at 56°C. during half an hour. After slight shaking in order to obtain a good mixture there was added a certain quantity of washed yeasts amounting to half a tablet of Fleischmann's yeasts. After energetic shaking in order to obtain a homogeneous mixture, the tube was placed into water bath at 37°C. for two hours. As control there are two tubes, one of them containing 2 c.c. of fresh serum and a corresponding quantity of yeast and the other containing 2 c.c. of serum inactivated by heat at 56°C. and an equal quantity of yeast emulsion.

After energetic centrifugation of these three tubes, the liquids were decanted and dosed as to their contents in third component. (See table V).

As may be seen from the table above, the yeast emulsion employed, considerably, reduced the alexic activity of the fresh serum (tubes 2 to 4) without altering the labile components of this serum (tube 5). This same emulsion did not attain, even slightly, the third component of the serum inactivated by heat, as is shown in the table (tubes 10 to 16). This serum after contact with yeast reactivates the yeast-treated-fresh-serum to the same title as the serum inactivated by heat which has not been in contact with yeast emulsion (tubes 17 to 21).

The mixture of fresh serum and 56°C. inactivated serum treated by yeast shows an evident decrease of the alexic activity. This activity is completly regenerated by addition of 56°C. inactivated serum (tubes 6 to 9). In tube 7, there was no trace of haemolysis, although there were 0.05 c.c. of fresh serum and 0.05 of inactivated serum, that is 2 haemolysing doses of alexin in labile fractions and 5 haemolysing doses in third component. There is therefore no doubt that the yeast emulsion was able to remove a great deal of the third component, from the heat inactivated serum in this mixture.

It means that instead of a preventive action of the heat inactivated serum against the adsorption of the third component of the fresh serum

in the mixture by the yeast emulsion, the contrary takes place, that is the presence of fresh serum in the mixture allows the inactivation of the third component to take place, not only of the fresh serum contained in the mixture, but also of the very serum inactivated by heat.

Thereefore what does take place is just as is for the inactivation of alexin by yeast emulsions the presence of thermolabile substances, which would be the direct cause of the destruction of the third component, were necessary.

Notwithstanding the plain evidence of these results, it must not be forgotten that in flocculation reactions, such as that of diphtheritic toxin by meeans of its antitoxin, the previous treatment of the serum by heat not only alters the optimum title of flocculation, but at times considerably retards the appearing and the formation of the specific precipitate. Now, if we take into consideration that gelose induces in fresh guinea pig serum a precipitate to appear, which is possibly caused by yeast emulsions too, the above expounded conclusion apparently reasonable cannot be admitted without reserve. Nevertheless for its further support we wish to recall the fact well established by Omorokow that the simple dilution of fresh serum in saline solution is sufficient to damage or to abolish the inactivation of the third component fact which seems to indicate the necessity of a minimum concentration of thermolabile substances in fresh serum in order that this process might take place.

It results from the aforesaid that the complexity of the complement is greater than it was up to date believed, and that in it, at least, five different elements may be demonstrated.

Order of succession of adsorption of the different alexic elements in specific haemolysis.

As already seen above, alexin is not a chemical compound formed by the two thermolable fractions of Ferrata. The regenerated alexic activity as shown by Brand, is the result of the separated action of these two substances which act after one another. We have already seen that sensitized bloods cells can fix the globulin fraction without being haemolysed and for their posterior haemolysis, although well washed in saline solution, the addition of the albumin fraction alone is sufficient. Employing a similar method, as also seen above, Weil could prove the fixation on sensitized blood cells not only of the globulin fraction but also of the albumin fraction, without obtaining haemolysis after having mixed them with fresh guinea pig serum previously deprived of the third component. These blood cells, after having been well washed, were haemo-

TABLE V

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fresh serum.	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fresh serum + Yeast	—	0.4	0.3	0.2	0 05	—	—	—	—	0.1	0.1
Fresh serum + Inactivated serum at 56° + Yeast	—	—	—	—	—	0.3	0.2	0.1	0.05	—	—
Inactivated serum at 56°+ Yeast	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.0
Serum at 56°	—	—	—	—	0.05	—	—	—	0.05	—	—
Saline solution	1.98	1.6	1.7	1.8	1.8	1.7	1.8	1.9	1.85	1.8	1.8
Sensitized blood cells	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc
Results	t. h.	traces	0	0	t. h.	t. h.	p. h.	0	t. h.	t. h.	t. h

t. h. = Complete haemolysis.

p. h. = Partial haemolysis.

0 = Lack of haemolysis.

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	0.02	0.01	0.005	0.002	0.001	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	0.02	0.01	0.005	0.002	0.001
5	1.87	1.89	1.895	1.898	1.899	1.88	1.89	1.895	1.898	1.899
.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
.	t. h.	p. h.	p. h.	p. h.	0	t. h.	p. h.	p. h.	p. h.	0

lyzed by the simple addition of guinea pig serum inactivated by heat. As also seen above, Nathan confirming these results called these blood cells hypersensitized. Summarizing, at the present state of the matter the alexic activity is the result of a series of adhesions of three substances in the following order:

Sensitized blood cells — Thermolabile globulin fraction — Thermolabile albumin fraction — Heat stable constituent or third component.

In order to confirm these results and to verify the sequence of adsorption of the alexic elements not yet studied under this point of view we proceeded in the following manner:

EXPERIMENT N° 1—Fresh guinea pig serum parcelled out in tubes was treated in conformity with the technique already described: by Formol (Serum formol), by Sodium hydrosulphite (Serum $S^2O^4Na^2$), by Ammonia (Serum NH^3) and by Yeast. A part of the same serum had been inactivated by heat during half an hour at 56° (Serum at 56°C.).

1 c.c. of serum at 56°C. was added to 5 c.c. of an emulsion of sensitized blood cells. (This emulsion was obtained by adding 2.5 c.c. of a 2.5 % solution of blood cells to 2.5 c.c. of a haemolytic serum containing 40 H. U. in each 1 cc.) After contact at 37°C. in water bath during one hour, the blood cells thus treated were centrifugated, weshed four times in saline solution and finally emulsioned in 5 c.c. of saline solution. They were then distributed among 5 tubes for haemolysis, at the dose of 1 c.c. in each tube.

To tube n. 1 – 0.1 cc. of Serum NH^3 was added.
« « n. 2 – 0.1 cc. of Serum Yeast was added.
« « n. 3 – 0.1 cc. of Serum Formol was added.
« « n. 4 – 0.1 cc. of Serum $S^2O^4Na^2$ was added.
« « n. 5 – 0.1 cc. of saline solution was added.

As the end of 1 hour of water bath at 37°C. the following results were read: 1st. tube: complete haemolysis.

2nd., 3rd., 4th., and 5th. tubes: complete lack of haemolysis. It was verified that none of the sera, at the doses employed in the experiment gave any trace of haemolysis in the presence of 1 c.c. of sensitized blood cells if the latter did not remain in contact with heat inactivated serum.

From this experiment it therefore results that the complement destroyed by ammonia is the first which adheres to sensitized blood cells, considering that the only serum able to induce haemolysis of sensitized blood

cells placed into presence of heat inactivated serum is in fact the serum in which this component had been destroyed. Neither yeast treated serum, nor formol treated serum, nor that treated with hydrosulphite are endowed with a like property, as is to be seen from the 2nd., 3rd. and 4th. tubes. The conclusions inferred from these results are justified, as is to be seen from the following experiment which is, so to say, the reciprocal of the former [1].

EXPERIMENT Nº 2—To 5 c.c. of blood cells previously sensitized, as in the preceding experimental, 1 c.c. of ammonia treated guinea pig serum (Serum NH^3) was added. After one hour of water bath at 37ºC. the blood cells were washed 4 times in saline solution, then emulsioned in 5 c.c. of the same vehicle and partitioned in 5 tubes at the dose of 1 c.c. in each.

To tube n. 1—0.1 cc. of Serum at 56ºC. was added.
« « n. 2—0.1 cc. of Serum Yeast was added.
» « n. 3—0.1 cc. of Serum Formol was added.
« « n. 4—0.1 cc. of Serum $S^2O^4Na^2$ was added.
« « n. 5—0.1 cc. of saline solution was added.

Result: After one hour of water bath at 37ºC. none of the tubes showed even a single trace of haemolysis.

Consequently, it results, therefrom, that without a previous adhering of the ammonia sensitive fraction to sensitized blood cells, no adsorption takes place of any of the other fractions known, no doubt therefore remaining that this is the fraction which first adheres to sensitized blood cells.

EXPERIMENT Nº 3—To 5 c.c. of blood cells sensitized, as above, 1 c.c of yeast treated serum was added and after water bath at 37ºC. during one hour the blood cells were centrifugated, washed four times in saline solution and finally emulsioned in 5 c.c. of this same vehicle. They were then distributed among 5 tubes at the dose of 1 c.c. in each and consecutively:—

---

[1] Having repeated this experiment many times we observed that the haemolysis is not always complete, but it always quite perceptible at the end of 1 hour. On the other hand, the inactivation by ammonia does not always enable us to obtain sera quite inactivated, and therefore, for the guarantee of these results, we carried out this same experiment repeatedly, adding increasing quantities of ammonia treated serum to sensitized blood cells and also to sensitized blood cells previously placed in contact with serum at 56ºC., and well washed. When compared with the 1st. control series, the results do not leave any doubt.

To tube n. 1—0.1 cc. of Serum ammonia was added.
« « n. 2—0.1 cc. of Serum at 56°C. was added.
« « n. 3—0.1 cc. of Serum Formol was adeed.
« « n. 4—0.1 cc. of Serum $S_2O_4Na_2$ was added.
« « n. 5—0.1 cc. of saline solution was added.

Result: At the end of one hour of water bath at 37°C. complete haemolysis was verified in the first tube, almost complete haemolysis in the second and entire lack of haemolysis in the third, fourth and fifth.

These results therefore fully confirm those obtained by Weil and Nathan, because the occurrence of haemolysis in the 2nd. tube proves that, the third component being absent, both Ferrata's globulin and albumin fractions are connected with the blood cells which are then haemolysed by simple addition of heat inactivated serum.

But as already seen above, the third component not being a single element but a mixture consisting at least of two substances, the one destructible by formol and the other destructible by sodium hydrosulphite, we performed the following experiment in order to see which of these substances first adheres to sensitized blood cells, already loaded by other alexic elements.

EXPERIMENT N° 4—To 5 c.c. of blood cells sensitized, as formerly, 1 c.c. of serum treated with hydrosulphite was added. After half an hour of water bath at 37°C. the blood cells were centrifugated, washed four times in saline solution and emulsioned in 5 c.c. of this vehicle. Finally, they were distributed among 5 tubes at the dose of 1 c.c. in each and consecutively: —

To tube n. 1—0.1 cc. of Serum NH^3 was added.
« « n. 2—0.1 cc. of Serum at 56°C. was added.
« « n. 3—0.1 cc. of Serum Yeast was added.
« « n. 4—0.1 cc. of Serum Formol was added.
« « n. 5—0.1 cc. of saline solution was added.

Result: In the 1st. tube complete haemolysis; in the 2nd. tube partial haemolysis; in the 3rd tube lack of haemolysis; in the 4th. tube complete haemolysis; in the fifth tube entire lack of haemolysis.

It therefore seems that the formol sensitive fraction adheres to the blood cells loaded with the ammonia sensitive fraction and with Ferrata's thermolabile fractions before the adsorption of the fraction sensitive to sodium hydrosulphite takes place. Indeed, the following experiment which is the reciprocal one of the preceding, plainly confirms this conclusion.

EXPERIMENT N° 5—To 5 c.c. of blood cells sensitized as previously 1 c.c. of formol treated serum was added. After one hour of incubator at

37°C. these blood cells were centrifugated, washed 4 times and emulsioned in 5 c.c. of saline solution. They were then divided into 5 tubes at the dose of 1 c.c. in each.

To tube n. 1—0.1 cc. of Serum NH^3 was added.
« » n. 2—0.1 cc. of Serum at 56°C. was added.
« « n. 3—0.1 cc. of Serum Yeast was added.
» « n. 4—0.1 cc. of Serum $S_2O_4Na^2$ was added.
« « n. 4—0.1 cc. of Saline solution was added.

At the end of one hour of water bath at 37°C. the following results were verified: in the 1st. and 2nd. tubes complete haemolysis; In the third, fourth and fifth tubes absolute lack of haemolysis.

By these two latter experiments it is thus plainly proved that the hydrosulphite sensitive fraction is the last in adhering to the blood cells and that this adhesion is that which finally determines haemolysis.

Passing on to the analysis concerning the conditions of osmotic permeability of the membrane of sensitized blood cells loaded with all the alexic fractions except the hydrosulphite sensitive one, we verified that when placed in hypotonic solutions they still assume a globular shape and when in hypertonic solutions (sodium chloride at 10 %) they take wrinkled appearance characteristic of good permeability to water. As well known, after Bordet, such a thing does not occur subsequent to complete haemolysis.

Summarizing: The different elements of which alexin is constituted, adhere to sensitized blood cells in the following order:

Sensitized blood cells—Ammonia sensitive (heat stable) fraction—Globulin (thermolabile) fraction—Albumina (thermolabile) fraction—Formol sensitive (heat stable) fraction and Hydrosulphite sensitive (heat stable) fraction.

Up to the moment of adhering of the last fraction, the membrane of the blood cells keep its integral hemipermeability.

The constituents of alexin in Bordet Wassermann's reaction. — As already mentioned above, and according to Skwirsky, in the reactions of Bordet and Gengou positive, both in Wassermann's reaction as well as in those in which antigen and antibody are present, the thermolabile globulin fraction of alexin is that which alone is fixed on the specific complexes while the thermolabile albumin fraction remains in the fluid free and active. Now, at the time of Skwirsky these constituents being the only known ones and in our days being admitted with great probability that Wassermann's reaction is essentially a reaction of precipitation, we deem-

ed it expedient to verify what part in this phenomenon is played by the heat stable constituents, mainly by the so-called third component because the latter, in general, not only accompanies the globulin fraction in the processes of separation of the thermolabile fractions, but also may be admitted as adhering to numerous colloidal suspensions, as it were, in an elective manner.

As is well known, the addition of 0.1 c.c. or 0.2 c.c. of guinea pig serum inactivated at 56°C. during half an hour to a mixture of luetic serum and syphilitic antigen prevents the fixation of the complement, transforming the positive reaction into a negative one. If the addition of serum inactivated by heat is carried out after the luetic serum having remained in contact with the corresponding antigen at 37°C. for the lapse of one hour, haemolysis however does not take place on the addition of a haemolytic system, a fact which shows that whilst being able to prevent the fixation, serum inactivated at 56°C. is unable to set the complement free from the fixation on the specific complex. Instead of inactivating the serum at 56°C., if we inactivate it at 54°C. for half an hour, one then verifies that it is able not only to prevent fixation but also to set it free from the complex on which it has adhered. This is shown in the following record of experiment: Syphilitic serum — strongly positive, inactivated at 56° during 30 minutes.

Kolmer's antigen diluted at 1/20; fixating dose: 0.3 c.c. Guinea pig alexin diluted at 1/10; doses employed: 0.3 and 0.5 c.c. corresponding nearly to 2 and 3 complementary units of the haemolytic system employed.

Haemolytic system: sheep blood cells sensitized by 40 haemolyzing units of rabbit anti-sheep serum (1 c.c. of a solution at 2.5 % plus 1 c.c. of a suitable dilution of haemolytic serum).

TABLE VI

REACTION

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8
Syphilitic serum	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—	—
Antigen	0.3	0.3	0.3	0.3	—	0.6	—	—
Alexin	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	—
Guinea pig serum at 56°C	—	—	0.1	0.1	—	—	0.2	—
Saline solution	1.2	1.0	1.1	0.9	1.5	1.1	1.5	1.6
Sensitized blood cells	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results	0	0	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	0

t. h. = Complete haemolysis.
0 = Lack of haemolysis.

TABLE VII

REACTION

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Syphilitic serum	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—
Antigen.	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	—	—
Alexin.	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	—	—
Guinea pig serum 56o.	—	—	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	0.2	—
Guinea pig serum 54o.	—	—	—	—	0.1	0.1	—	—	—	—	—	0.2
Globulin fraction.	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	—	—	—	—
Albumin fraction.	—	—	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	—	—
Saline solution.	1.2	1.0	1.1	0.9	1.1	0.9	0.2		0.2	—	1.8	1.8
Sensitized blood cells.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results.	0	0	0	0	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	t. h.	0	0

The first 5 elements in conformity with the table were left in water bath at 37°C. before the 6th. one, constituted by sensitized blood cells, was added to them. The haemolysis was read after a delay of another half an hour at 37°.

The preventive action exerted by the serum inactivated at 56°C. is well manifest upon the fixation.

In the following table both the guinea pig serum inactivated at 56° and 54°C. as well as the thermolabile fractions of alexin were added, after the mixture of syphilitic serum and antigen having been left in contact with the doses used o alexin for one hour in water bath at 37°.

As may be seen, the serum at 56°C. is unable to set free the alexin fixed in the reaction, whereas it is liberated not only by the serum inactivated at 54°C. but by any one of the alexic thermolabile fractions. It is however worthy of notice that the addition of globulin fraction induces haemolysis more rapidly than the addition of albumin fraction; it is also quite certain that after fixation of complement in a strongly positive Wassermann's reaction not only globulin fraction but also albumin fraction seems to remain free in the fluid. In serum heated at 54°C. for half an hour, there exists, although in small quantities, thermolabile fractions also active, as may be seen from the following table:

TABLE VIII

TUBES	1	2	3	4	5
Guinea pig serum at 54°C.	0.1	0,1	0.2	—	—
Globulin fraction.	1 cc.	—	—	2 cc.	—
Albumin fraction.	—	1 cc.	—	—	2 cc.
Saline solution.	0.9	0.9	1.6	—	—
Sensitized blood cells.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Results.	t. h.	t. h.	0	0	0

These results seem to render plausible the existence of a component destructible at the temperature of 56°C., yet different from Ferrata's thermolabile components, and to recall the constituent noticed by Bruinoghe in the inactivation of alexin by means of distilled water.

It seems however bold to draw any conclusion from these results: firstly, the serum at 54°C. containing Ferrata's labile fractions only partially inactivated, its addition to a positive reaction may give as a result a

mere summ of effects; secondly, the serum at 56°C. being able to prevent the complement fixation in Wassermann's reaction, the hypothesis ought not to be despised that the serum at 54°C. being less altered by the temperature may have a greater affinity with the complement than the antigen-luetic serum complex, being therefore able to dislodge it therefrom. This latter hypothesis, in our opinion, however does not seem to be the less probable.

Origin of alexin.—The knowledge of the influence exerted by liver on the contents in alexin of sanguineous serum is due to Nolf. The influence is of such character that this author did not hesitate to ascribe to the liver the rôle of an alexin generating organ. Later on, Müller could prove that an operative shock, a more severe one than that caused by the extirpation of this organ, like that which results from the evacuation of all the abdominal organs except the liver, does not exert the same action upon alexin but, the liver being removed together with the other viscera, the contents of alexin shortly afterwards sensibly decrease, thus proving that the intestinal products passing directly into circulation are not those which become responsible for the decrease of the serum complement. According to Müller, one can even prove the formation of alexin in livers isolated from animals and preserved in a state of life by means of artificial circulation.

Friedberger and Seelig working on frogs verified that the haemolytic power of these animals strongly decreases after hepatectomy.

In 1911, Dick in an excellent paper proved that among 11 dogs after extirpation of the pancreas, though all presenting a great quantity of sugar in the urine and 6 exhibiting intensive acidosis, in none of them a decrease of serum alexin was observed. The removal of pancreas and duodenum as well as the simultaneous removal of pancreas and spleen induced no alteration of the contents in alexin. The same occurs after extirpation of adrenals, small intestine, stomach, thyroid gland or kidneys. Considering the difficulty of performing a hepatectomy, Dick tried to eliminate the hepatic function by means of toxics for the liver. With this aim in view he used chloroform as well as hydrazin sulphate. Both with the former as with the latter he constantly observed in the animals subjected to the experiment a strong decrease of alexic activity of the serum inferring therefrom that either alexin is formed in the liver or the activity of the liver depends on the presence of alexin in blood. In the experimen-

tal intoxication by phosphorus, Ehrlich and Morgenroth since 1900 had observed in guinea pigs the complete disappearance of the complement.

Except Liefmann who observed no decrease of the haemolytic power of frogs after extirpation of the liver, the other authors who deal with this study all agree on the strong influence exerted by the liver on the regulation of serum alexin. Forming another exception, Rosenthal recently performing the liver extirpation by Mann and Magath's process, arrived at the conclusion that complement is not formed in this organ, because the alexin contents decrease in serum only 11 hours after extirpation of this viscus. According to the same author, fibrinogen also decreases — a singular thing ! — in the circulating blood exactly 11 hours after removal of the liver. As Rosenthal does not give any judgment on it, it is to be believed he does not consider admissible the hepatic origin of fibrinogen, nowadays admitted by all the authors recently engaged in this study, and which origin, according to Wöhlich, has to be considered as proved.

The most difficult problem to be resolved both as to the relationship of liver and alexin as well as to that of liver and fibrinogen is to know whether this organ is in reality the originating organ of these substances or just only a regulator of their amount in the serum. In the case of alexin, which as has been seen is a complex of 5 different elements, it should at least be cleared up first of all whether all or some of them are or are not influenced by the liver. In this respect we carried out some experiments on dogs following Dick's technic now with hydrazin sulphate now with chloroform. The experiments with hydrazin having given a less pronounced decrease of alexin than the intoxication by chloroform, we performed with the latter our most detailed experiments which proved that the intoxication of the liver induces a decrease not only of alexin as a whole, but also of every one of its elements into which it can be decomposed for the present.

This is the record of one of our experiments performed on dogs:

A dog weighing 12 kilos was chloroformed and left in deep narcosis for the period of 2 hours and 20 minutes, having been employed for this purpose about 100 c.c. In the following table will be found the dosages performed in the blood of this animal before the chloroformization took place and 40 hours after it. As to dosage, the haemolysis was always performed as above, that is: a 2.5 % solution of washed sheep blood cells sensitized by 40 H. U., the reaction being performed in a total volume of 4 c.c. of liquid.

TABLE IX

Dosagens of alexin and of its components.

	Before chloroformization	40 hours after chloroformization
Alexin	0.08 cc. t. h.; 0.04 cc. 0	0.3 cc. t. h.; 0.2 cc. 0
Alexin+0.1 cc. of serum at 56°	0.04 cc. t. h.; 0.02 cc. 0	0.2 cc. 0
Alexin+0.2 cc. of serum NH^3	0.02 cc. t. h.; 0.01 cc. 0	0.2 cc. t. h.; 0.1 cc. 0
Alexin+0.1 cc. of serum formol	0.04 cc. t. h.; 0.02 cc. 0	0.2 cc. 0
Alexin+0.1 cc of serum $S^2O^4Na^2$	0.002 cc. t. h.; 0.001 cc. 0	0.04 cc. t. h.; 0.01 cc. 0
Alexin+Albumin fraction	0.04 cc. t. h.; 0.02 cc. 0	0.06 cc. t. h.; 0.04 cc. p. h.
Alexin+Globulin fraction	0.02 cc. t. h.; 0.01 cc. 0	0.15 cc. t. h.; 0.1 cc. t. h. 0.08 cc. 0

t. h. = Complete haemolysis.

p. h. = Almost complete haemolysis.

0 = Lack of haemolysis.

As may be seen clearly, all the components of alexin underwent reduction. The total alexin exhibited a value nearly 5 times less than that of its original content. The ammonia sensitive component as well as the formol sensitive and hydrosulphite sensitive components exhibited a still greater decrease, about ten to twenty times less than in the blood of a healthy animal. The thermolabile albumin fraction of alexin was reduced to about a 1/5 of its original value and only the globulin fraction exhibited an insignificant decrease, presenting an almost complete haemolysis with a dose which before chloroformization gave complete haemolysis: 0.04 c.c. These results show that the decrease of the alexic value as a whole is mainly due to the lack of elements contained in the thermolabile albumin fraction, confirming Dick's results obtained by intoxication of dogs with chloroform as well as those met with by one of us (Costa Cruz) in yellow fever, a fact which led these authors to believe that the liver should be held responsible for the producing of this fraction. Then, all the other fractions, except perhaps the labile globulin fraction, appear to be dependent upon a greater or lesser activity of the liver.

The question whether liver is a mere regulator of serum alexin or its generator seems to be devoid of interest, since the removal of any organ other than the liver exerts no action upon the alexic contents of blood. In this respect, availing ourselves of the opportunity offered to us by the kindness of Dr. M. Osorio de Almeida we had occasion to accompany during 4 to 5 hours the alexic contents of three dogs subjected to decerebration without observing the slightest decrease of alexin, though in some of them

temperature had risen to 45°C. owing to intentional exposure of same to sun rays.

Moreover, in the dogs which underwent chloroformization we observed that the decrease of alexic contents is visibly proportional to the quantity of coagulum formed by the same quantity of extracted blood. Now, the irregularities observed in the coagulation of blood in dogs under such conditions are dependent mainly, if not exclusively, upon a decrease of contents of the circulating fibrinogen (Whipple and Hurwitz). The parallelism between the decrease of fibrinogen and the decrease of complement in liver intoxications is already brought into evidence by the results obtained by Whipple and Hurwitz as to fibrinogen, and by those of Dick as to alexin; the former come to the conclusion that this decrease is proportional to the degree of liver necrosis, a conclusion at which also the latter arrives as to the decrease of complement. In the chloroformic intoxication this parallelism is of such evidence that we resolved to undertake dosages of fibrinogen in the animals under our experiment, in the blood of the same letting which furnished the material for the dosage of alexin. The dosages of fibrinogen were performed by Chandler's method, thanks to the valuable collaboration of our colleague Dr. G. Villela, together with whom we shall publish in the future a more detailed report of this matter. The following is the record of an animal examined in this respect:

A dog weighing 8 kilos was subjected to chloroformization and left in deep narcosis during 2 hours and 10 minutes, about 90 c.c. of chloroform having been employed in this space of time.

TABLE X

Dosage of fibrinogen		Dosage of alexin
Before chloroformization	0.42 o/o	0.8 cc. t. h.
45 hours after chloroformization	0.15 o/o	0.3 cc. t. h. and 0.2 cc. p. h.
68 « « »	0.17 o/o	0.22 cc. t. h.
90 « « «	0.21 o/o	0.17 cc. t. h.
160 « « «	0.41 o/o	0.085 cc. t. h.

The dosages of complement being made with sufficient accuracy, the correspondence of values is of such order as to allow us to calculate

through the former the fibrinogenic contents in these animals by a mere inverted proportion.

The truth is that, if this so narrow parallelism does not suffice to prove fibrinogen and alexin to be produced in the one and same organ, it is none the less true that all the reasons prevailing to induce the majority of authors to agree on the hepatic origin of fibrinogen are the same good reasons which militate in favour of an agreement, not yet complete, as to the hepatic origin of alexin.

SUMMARY

1) The writers state that after the inactivation of fresh Guinea pig' serum at 54°C, for 30 minutes, this serum keeps the thermolable fractions in noticeable quantities. Such serum if mantained at 6°C. for 18 hours, reacquires part of the lost alexic activity.

2) The writers confirm the existence of four components of the alexin.

3) The Ritz's, and Coca's 3rd component is formed at least by distinct elements, one sensible to the action of formaline and the other to the action of sodium hydrosulphite.

4) Ammonia, formaline and sodium hydrosulphite are able to destroy the thermostable components of the serum inactivated by heat (56°C., 30 minutes). The emulsions of yeast, organs and gelose are not able to do so.

5) The yeats emulsions added to a mixture of equal parts of G. p. fresh serum and serum inactivated by heat are capable to destroy the 3rd component present not only in the fresh serum as also in the inactivated one.

6) The writers do not exclude the hypothesis of a flocculation in which the inactivated serum exerts the rôle of a protector colloid, but they believe that the inactivation of the complement by yeast emulsions is due to the action of thermolabile substances of fresh serum after the adsorption of antitriptic substances by said emulsions.

7) The different components which form the alexin adhere to the sensitized blood cells in the following order: Blood cells-sensitizer-Thermostable fraction sensible to ammonia—Thermolable globulin fraction — Thermolable albumin fraction—Thermostable fraction sensible to formaline and thermostable fraction sensible to sodium hydrosulphite.

8) In the Bordet-Wassermann's reaction, stark positive, is fixated especially the thermolable globulin fraction and not only the 3rd component

as it could be supposed. The thermolable albumin fraction remains free and active in the fluid.

9) The writers think that the hepatic origin of the alexin must be accepted. According to experiments on dogs intoxicated by chloroform one observes not only the diminution of the alexic activity but also the decrease of all components of the alexin, with, perhaps, the exception of the thermolable globulin fraction.

A Classificação do "Oidium brasiliense" (*)

Neogeotrichum pulmoneum, n. g.

(O. Magalhães, 1914), emend. O. Magalhães, 1931.

pelo

DR. OCTAVIO DE MAGALHÃES

(Com as estampas XXXVI – XL).

Em Setembro de 1914 denominámos *Oidium pulmoneum* um cogumelo, julgado novo, que insuláramos, em 1912, do escarro de individuos com um syndromo de tuberculose pulmonar, em franca evolução secundaria.

Questões, porém, de regras de nomenclatura botanica fizeram-nos, no mesmo anno, para evitar a synonimia, modificar aquella designação para a de *Oidium brasiliense* [1], [2].

Guiou-nos nesses estudos o trabalho de Link—H. F.: 1809. Obs. Ord. Pl. nat. Bul. Mag. 3, pg. 18 *15 Genus Oidium emendavit Pinoy,* caminho esse que já haviam trilhado tambem A. Castellani e De Beurmann e Geougerot. Nos trabalhos de synthese que publicámos em 1923 e 1925 [3], [4], dissemos: «A denominação de *Oidium* dada ao parasita causador da molestia, deve ainda persistir, apesar das opiniões em contrario dos Professores Brumpt e Langeron. O estudo botanico do parasita afasta-o, de um modo absoluto, do genero *Monilia* Gmelin 1791. Seria antes um *Mycoderma,* si melhor não fosse deixal-o onde se acha, até que appareça um novo Linneu, capaz de pôr um pouco de ordem no cháos de classificação dos Arhizophytos». Mais adeante, na pg. 661, «O interessante é encontrarmos elementos livres, com formas rectangulares (figs. 79 e 80 estampa 12. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1918, T. X., F. 1) e quadrangulares, proprias dos *Mycodermas*.

(*) Recebido para publicação a 31 de Dezembro de 1931.

1 Brasil Medico, 15 de Setembro de 1914. pg. 313. 1a. Nota prévia.
2 Brasil Medico, 22 de Outubro de 1914. n. 40. 2a. Nota prévia.
3 Sciencia Medica, 30 de Novembro de 1925. Anno III, pg. 600.
4 "Radium", Bello Horizonte, Outubro de 1923. pgs. 18-20.

Como se vê, claramente, já naquella época, 4 annos antes de Bolognesi e Chiurco, a idéa de incluir o parasita entre os *Mycodermas* nos preoccupava. Temiamos, porém, retirar o cogumelo de um local pouco abrigado para outro não mais seguro.

Era a resposta aos trabalhos dos Professores E. Brumpt (Précis de Parasitologie, 1922, pg. 1.100) e M. Langeron (Traité de Medicine, 1922, pg. 485), que collocaram o novo fungo no Genero *Monilia*, Gmelin. Syst. Nat. 1791, *Monilia brasiliense* (O. Magalhães, 1914) ou melhor *Monilia pulmoneum* (O. Magalhães, 1914) o que viria incidir em synonimia.

O estudo botanico do *Oidium brasiliense*, seu aspecto nas culturas macroscopicas e, o que mais é, nos tecidos, as reacções provocadas, justificavam a nossa maneira de vêr.

Recentemente os Srs. Bolognesi e Chiurco not. Micose chirurgiche, pg. 593, Sienna, 1927 e o Sr. M. Bailey K. Ashford—Bulletins de la Soc. de Pathologie Exotique, 1929, nº 2, T. XXII, 13 Février, mudaram o cogumelo que descrevemos, para o Genero *Mycoderma*, justificando o que disseram os Srs. B. Ciferri e P. Redaelli, nos «Studies on the Torulopsidaceae», pg. 272, Annales Mycologici, vol. XXVII, nº 3/4, 1929.

«Also the *Oidium brasiliense* of Magalhães (Sur les lesions provoquées para l'Oidium brasiliense. Compt. Rendus de la Soc. de Biologie, V. 97, nº 27, pg. 1093-1927) a culture of which species we, through the courtesy of Dr. K. R. Ashford, have been able to observe, is nothing but a *Mycoderma*. Bolognesi and Chiurco (Micose Chirurgiche, pg. 593, Sienna 1927), would also appear to be of the same opinion, and to these authors should be assigned the priority of the new generic position of the fungus, whose denomination should be *Mycoderma brasiliense* (de Magalhães 1914) Bolognesi and Chiurco».

Pelo que vimos atraz, a emenda talvez devesse caber ao proprio auctor destas linhas. Recentemente o Sr. M. B. K. Ashford (Bull. Soc. Path. Exotique, 1929, nº 2, T. XXII, 13 F. e The Journal of American Med. Association, pg. 762, vol. 93, nº 10, Septembre 7, 1929), estudando a flora do intestino no *sprue* tropical, não só encontrou uma alta percentagem do *Oidium brasiliense* (12,3 %), como asseverou que os *Mycodermas* insulados não se differenciavam daquelle fungo. Para elle o *Oidium* era um *Mycoderma*. Já agora não nos podemos mais calar.

Ora, nós já estamos antevendo, nessa crise de systematica em a qual se debatem, não apenas os cogumêlos, sinão tambem outras partes da botanica e algumas da zoologia, que a parada talvez não seja definitiva e, a breve trecho, o cogumelo mude, ainda uma vez, de nome e lugar . . .

Vimos fazendo, já ha tempos, o estudo daquillo que se poderia chamar o «historico dos generos», afim de vêr aonde seria possivel encaixar,

com relativa exactidão, o *Oidium brasiliense* e outros fungos pathogenicos, que vamos encontrando em nossos estudos.

Não é cousa facil, mórmente em nosso meio, pobre de bibliographia classica, antiga, botanica. Consola-nos, porém, a certeza de que essa queixa tambem tem vindo de mais alto e em meios scientificos mais ricos.

Devemos, em parte, essa leitura esclarecedora ás fichas particulares do illustre mycologista do Instituto Oswaldo Cruz, Rio, o Dr. Olympio da Fonseca Filho, que as organizou nos Estados Unidos e Europa. Faltam-nos ainda alguns dados bibliographicos, para um estudo mais amplo do assumpto. O que já temos chega, comtudo, para a explanação do nosso thema.

Sempre nos batemos, na localização systematica dos fungos, pelo estudo aprofundado na parte microscopica e biologica dos parasitas. As culturas gigantes, macroscopicas, nos meios artificiaes podem, é certo, coadjuvar a systematica; não bastam todavia. Houve época em que ellas decidiam a questão. Esta época passou. Hoje, os fungos parasitas não constituem mais uma excepção botanica, creada pelos pathologistas. Faz-se-lhes a systematica á luz dos conhecimentos, das regras e leis da botanica em geral. Não é só isso. Pedem-se a biologia do microbio, a acção pathogenica, a morphologia, o modo de reproducção no *hospede* e na natureza; o modo de comportar-se em alguns dos meios artificiaes e até o papel fermentaticio do mesmo fungo.

Temos, é verdade, sobre essa ultima parte, algumas reservas. Sem chegar ao exaggero de suppôr que se póde até classificar um assucar por um cogumêlo, achamos o poder fermentaticio bom meio auxiliar para a diagnose.

Não é tarefa facil para quem quizer acertar. E' preciso, porém, não esquecer que a passagem pelo hospede, animal, a vida parasitaria em outro reino, póde crear-lhes um aspecto especial, particular, que não convem desprezar. E' preciso não querer submetter tudo, rija, automaticamente á nomenclatura já estabelecida, forçando muita vez lugares, que dahi ha pouco são abandonados.

Foi isso que tentámos fazer com o *Oidium brasiliense*, desde os nossos primeiros estudos. Ora com esse criterio moderno, sobre a systematica dos fungos, muito poucos generos, creados pelos botanicos de outróra, resistirão á critica.

Em recente artigo (Comp. Rendus de l'Acad. de Sciences, nº 11, 9 Sept. 1929, pg. 405), o Prof. P. Vuillemin diz textualmente o seguinte: «Le caprice de la synonymie n'a d'autre frein que le retour aux noms de genre dont la priorité *repose sur une definition basée sur les caractères botaniques précis*». O grypho é nosso. A precisão é relativa ao tempo e á

evolução das sciencias. O genero *Oidium* descripto por Link era, no dominio da botanica, dos mais precisos, rigorosos e justos em 1809. E' precario em 1929...

Assim tambem o genero *Monilia* (Persoon, C. H. 1822, Myc. cur. 1/3. 967 e Gmelin Systm. Nat. 1791) e particularmente o Genero *Mycoderma*. Isso para não sahir daquelles que no momento nos interessam.

Dahi as «emendas», ou então a coragem scientifica de um Aldo Castellani, que, na definição do genero *Monilia,* (Manual of Tropical Medicine-Castellani and Chalmers, 1919, pg. 1079) escreveu: «*Monilia.* Definition Vague». Dahi tambem uns seguiram as «emendas» de um Saccardo; outros de um Pinoy e outros ainda de um Vuillemin ou Guillermond e cada qual vê nos outros um «enganado», um «errado». Os Generos *Oidium* e *Mycoderma* e *Monilia* são disso exemplo acabado. O Genero *Oidium* de Link—1809—*sensu strictu,* nada tem que vêr com o que descreveu Saccardo. (P. H. Saccardo, Sylloge Fungorum, V. 4, 1886, pg. 40).

O «Thallus floccis caespitosis septatis, ramosis etc.» de 1809 não póde ser egualado ao «Hyphae steriles decumbentes, sporophora erecta»... e «Sistit ut plurimuni statum conidicum Erysiphaerarum», etc. E' tal a differença, que Jaczewski não trepidou, em 1927, em descrever Genero *Oidium* Saccardo nec Link ! O'ra, dessa maneira, o verdadeiro seria crear generos novos !

O genero *Oidium,* hoje, está restricto. Ascomycetos, familia dos Erysiphaceas e Perisporiaceas, fungos parasitas de plantas. Outróra, não.

A interpretação que Pinoy dava aos *Oidium,* de Link, como podendo ser tambem cogumelos... pathogenicos para homens e animaes, «com hyphas terminando em cadeias de esporos (aceita por muitos), hyphas longas e ramificadas, septadas; sporophoros simples e septados, dissociando-se em conidios, em cadeias, ovoides ou cylindroides», foi abandonada.

Os botanicos modernos não seguem esta orientação de Pinoy e preferem deixar insulados na phytopathologia os cogumelos do genero creado por Link.

Ora os primeiros estudos que fiz, sobre o *Oidium brasiliense,* permittiram-me incluil-o nesse grupo, seguindo a orientação de Pinoy. [5]

A transformação do genero *Monilia* não foi menor. Creado [5] em 1791 por Gmelin (Systema natural. pg. 1287), foi, durante muito tempo, dada como sendo de Persoon (Synopsis methodium fungorum 1801 Göttingae).

Persoon, aliás, (P. C. H. 1822, Myc. europ., V. 1. pg. 29-31) confundia, nessa época, Monilia com Aspergillus e dizia «XIX. Monilia. Flocci

---

[5] P. Vuillemin (Les Champignous parasites et les mycoses de l'Homme. Pg. 79 (1931) attribue a J. Hill (1751) a creação do termo.

discreti aut cespitoso, erecti (Stipitiformes) subincrassati. Sporulae *in Capitulum* aggregatae, in nonnullis seriatae, subrotundae (aspergillus Link). Saccardo (P. A. Saccardo. Sylloge Fungorum Vol. 4. 1886. pg. 31), diz: Monilia Pers. emend. Sacc. Mich II, p. 17, nec. Fr. (Etym. monilie, ob conidia moniliformiter juncta).

«Hyphae erecta vage ramosae, sæpe cæspitulus densos efficientes, rarius effusæ, huic inde denticulus sporophoros exserentes. Conidia majuscula in catenulos initio digesta. Huc forte ducendae nonnullae Oosporae species huc usque imperfecte exploratae».

Lühmemann, G. H. 1809, in Schrad. u. J. III. 3, pg. 54; Rebentische J. F. 1804. Prodr. Fl. Weonarch., pg. 393, onde vemos *Monilia*: «Sptipitata aut effusa. Fila. moniliformia seu articulata», modificação da primitiva de Persoon: «Stipitata aut effusa byssoidea, fila moniliformis articulata», adoptada por A. Castellani, em falta de melhor; Wallroth (K. F. W. 1833, Fl. crypto. Germ. p. post. t. 4. pg. 184-5) que dá o nome generico de *Oospora* ao grupo das Monilias, estudaram, sem profundeza, a questão.

P. Vuillemin, em 1921, (P. V. Bull. Soc. Mycol. France. T. 27, pg. 137, 1921. Difference fondamentale, entre le genre Monilia et les genres Scopulariopsis, Acmosporium et Catenularia) fez um estudo mais serio da questão. Não conseguiu, comtudo, resolvel-a.

Vuillemin prefere a classificação de Gmelin á de Persoon e julga fundamental ao genero a multiplicação pela «Gemulação».

Ora a definição de Gmelin pécca, ao nosso vêr, pelo mesmo erro da de Persoon.

Em 1923, Reckhout crêa o genero Candida, proximo ou confundindo em parte com *Monilia, Endomyces, Mycoderma,* etc.

Pollaci G. e Nannizzi A. (R. Acc. d. Fisiocritici, Siena, Adunanza 25 Marzo 1927, pgs. 1—11 figs. 1—3) procuram esclarecer, em vão, o assumpto. A classificação dos Hyphomycetos proposta por P. Vuillemin e acceita por certo numero de mycologistas, veio mostrar que tinhamos razão quando affirmavamos que nem sempre é possivel encontrar nas systematicas botanicas, em geral, um lugar certo para os cogumelos pathogenicos para homens e animaes. Ou é preciso dar uma certa elasticidade aos generos antigos ou então crear generos novos. A concepção moderna (Vuillemin) de Monilia é de um Hyphomyceto Thaloesporado «Blastoesporado» (de $\beta\lambda\alpha\sigma\tau\eta$ = gêmula).

Assim define Brumpt. (E. Brumpt pg. 1234—Précis de Parasitologie, 1927, 1 vol. Masson et Cie. Editeurs). «Genre Monilia Gmelin 1791. Description: Mycelium rampant, cloisoné, se dissociant rapidement. Conidiophores generalment dressés, grêles, simples ou dichotomisés, épars ou

formant parfois des grappes serrées, emmettant a leur sommet une chainette de conidies grosses ovoides, inegales, très rarement spheriques, souvent munies d'un appareil de disjonction. Donnent des cultures blanches crémeuses sur les milieux solides 1) Monilia albicans (Ch. Robin 1853)».

Vuillemin (Rev. gen. des Sci. 1905) mostrou que no grupo das chamadas *Monilia albicans* ha uns, pelo menos, que são Ascomycetos da familia dos Endomycetinae. Dahi Endomyces albicans. Não foi só o asco que precisou alguns *Endomyces albicans*, sinão tambem e principalmente, os «esporos internos».

Não é o asco que caracteriza o *Coccidioides immitis*, mas as suas formas de reproducção, já tão conhecidas.

Ao nosso vêr, o *Oidium brasiliense* não pertence a nenhum desses grupos.

Batem-nos contra o processo de só julgar bôas para a classificação algumas das formas de reproducção dos cogumelos.

Quando um cogumelo tem fórma fixa, como «basidios», «ascos» ou «ovos», vá que se julguem e verifiquem principalmente essas formas.

Mesmo assim, é necessario procurar fóra desses elementos—dados para as subdivisões. Quando é, porém, um «Fungi imperfecti cogni», então é que não sobra razão para olharmos exclusivamente para esta ou aquella fórma e para este ou aquelle caracter destas.

Não sei porque si hão de tomar apenas no *Oidium brasiliense* aspectos «rectangulares» dos seus arthroesporos, deixando, sem a menor referencia á variedade innumerada de suas formas de invasão: «bacillares», «coccaes», «navette», «gemulação» e «mosaico», etc., que são as fórmas de *reproducção* mais frequentes, mais importantes, sinão as unicas, para a perpetuação da especie nos hospedes !

Como desprezal-as, si são justamente estas fórmas dos hospedes que tão eloquentemente nos falam no grande grupo das Tinhas ? Quem poderá, em bôa fé, negar o grande passo, nesse terreno, trazido para o conhecimento dos Microsporos, Trichophyton, Achorion, pelo talento de Sabouraud ? Quem poderá desprezal-as no grupo das Blastomycoses ?

Fomos um dos primeiros a chamar a attenção dos especialistas para essas fórmas minimas de alguns cogumelos pathogenicos, fóra dos «Microsiphonados». Nossa voz não foi ouvida. Folgamos muito em vêr como agora começam ellas a apparecer na Pathologia como elementos que não são mais julgados «contaminações de culturas».

---

[6] Ensaios de Mycologia. M. Inst. Oswaldo Cruz, V. XIX, T. II. 1926.

(The Am. Journal of the Med. Sciences, vol. CXXXVIII, nº 4, October, 1929, nº 691—pg. 515. Mye, R. Hergas. L. C. e Cornwoell, A). Já não falamos nas «cellulas de resistencia», kystos e elementos que lembram *clamydoesporos,* já assignalados no *Oidium brasiliense.*

Chamamos a attenção aqui para as fórmas nas culturas (Vide desenho nº 1), relativamente raras, de «endoesporulação». No interior [6] delles se percebem fórmas arredondadas, como no *Coccidioide immitis.*

Pela descripção de Brumpt, a differença, como o Genero *monilia,* começa já nos aspectos das culturas macroscopicas. Sem consideral-as decisivas para a classificação das especies, é elemento, comtudo, para não se desprezar. Jamais, em cultura de meios artificiaes, o *Oidium brasiliense* apresenta o aspecto «blanche crémeuse sur les milieux solides».

Aliás, no artigo das Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 1918, estampa 12, pgs. 8 e 9, damos até desenhos, para se apreciarem bem as differenças das culturas incipientes do *Endomyces albicans* e *Oidium brasiliense,* no meio de Sabouraud maltozado. A photographia das culturas na batata, cenoura, Sabouraud, com varios assucares, mostram-no tambem, com grande nitidez (Ob. cit. Est. 4).

A differença, porém, é intransponivel, no estudo microscopico do microbio.

Na subdivisão dos Thalloesporados, da classificação de Vuillemin, vemos:

a) Arthroesporados (*Mycoderma, Madurella, Indiella, Trichosporum*);
b) Blastoesporados: *Cryptococcus, Monilia, Enanthiothamnus Hormodendron, Cladosporium, Malazzezia, Pityrosporum.*

Os primeiros caracterizam-se pelos *arthroesporos,* quer dizer fragmentos provenientes da desarticulação do thallo, cortados a pique ou arredondados.

Os segundos differenciam-se pelos blastoesporos, quer dizer globos ovoides ou arredondados, nascidos, por gemmação, do vertice ou contorno de filamentos longos, etc.

Ora, por esse criterio, o Oidium brasiliense não póde ficar exclusivamente em nenhum dos 2 grupos. Elle possue, nitidamente, ambas as fórmas—ob. cit. Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, 1918, pg. 7, fig. 73 e est. 13, numerosas figuras. Estampa 6, photographia 9; estampa 5 e Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 1929. T. XXII. O. Magalhães. Contribuição para o conhecimento das lesões provocadas pelo *Oidium brasiliense* (O. Magalhães, 1914).

Ha tambem fórmas (ob. 1929. Est. 11. Photog. nº. 4. Estampa. 19. Photographia nº 12, estampa 23. Photographia nº 17) que lembram as do *Coccidioides immitis*. Por outro lado, encontramos verdadeiros *arthrosporos*, (Ob. cit. 1918, est. 13, numerosas figuras), que fazem approximarnos do genero *Mycoderma* (sensu Vuillemin).

A inserção dos conidiosporos e respectivo aspecto é fundamentalmente differente do genero *Monilia* e do *Oidium brasiliense*.

Não é só isso. As lesões anatomo-pathologicas das Monilias são outras.

As reacções de tecido das Moniliases caracterizam-se pela fórma giganto-cellular, com infiltração leucocytaria mixta e Plasmazellen.

Não vimos assignaladas lesões hemorrhagicas. Nas lesões pelo *Oidium brasiliense* não vemos reacção giganto-cellular e plasmazellen. Vemos reacção leucocytaria mixta, mas particularmente lymphocytaria, cellulas epithelioides, infiltração peri-vascular e formidaveis fócos hemorrhagicos, que muita vez substituem o tecido nobre, em o qual se assesta o parasita. Teriamos outra impressão, si seguissemos a opinião de Guillermond (Clefs dichotomiques) pour la determination des levures A. Guillermond, 1928, 1 vol. pg. 68), que define «Monilia (Gmelin): Champignons végétant sur moût de bière, sous forme d'un voile mycodermique, ou rarement d'un simple anneau, d'abord composée par des Levures, et bientôt ensuite par un mycelium typique, donnant naissance, par borgeonnement latéral ou terminal à des Levures et ne produisant jamais d'asques. Parfois, désarticulation du mycelium en arthroespores».

E. Guillermond dá ainda uma nota (nº 4), em que defende, com Vuillemin, a definição de Gmelin, dizendo ser necessario não a confundir com a de Persoon, que se applica a cogumêlos mais evoluidos: fórmas inferiores de *Penicillum*.

Ora Gmelin commette o mesmo erro de Persoon quando, no Syst. naturae, 1791 pg. 1287., divide o genero em 2 partes:

1) Filamoniliformia in *capitulum congregata*, como Persoon.
2) «Sessiles».

Foi justamente o *in capitulum congregata* que fez Vuillemin abandonar a definição de Persoon, que, ao nosso vêr, se louvou no erro de Gmelin.

Guillermond diz, porém, que são especies typos do genero—a *Monilia candida* (Bonarden) e a *Monilia variabilis* (Linduer). Ora, as differenças entre o *Oidium brasiliense* e este «typo» são tão accentuadas, que nos dispensam de repetir os caracteres do nosso fungo.

Aliás, o genero talvez se desdobre com a sahida da *Monilia Candida*, que devia passar, segundo pensa Berkhout (1923) In die Schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora od Torula, Sehevenigen pg. 72) a chamar-se, Genero *Candida*: Berkhout 1923.

Candida candida (Bon) Berkhout, 1923 e a *Monilia albicans*, com algumas especies, que serão certamente *Endomyces albicans*.

Resta-nos agóra o estudo do genero *Mycoderma*, de tão palpitante actualidade. Neste grupo foram incluidos, recentemente, pelo Prof. P. Vuillemin (Mycoderme. Note (1) de M. Paul Vuillemin C. R. A. Sciences, Séance du 2 septembre 1929), o antigo *Tricophyton cruris* Castellani, 1905, [7], o *Trichophyton concentrium* [8] R. Blanchard, 1899 e o *Endodemphyton Roquettei*, O. Fonseca, 1928, todos num grupo por elle chamado *Hyphomycoses*, cogumêlos que se assestam na pelle e provocam lesões por «hyphas alongadas», ao encontro das *brachymycoses*, que se localizam *quettei*, O. Fonseca, 1928, todos num grupo por elle chamado *Hyphomycoses*, cogumelos que se assestam na pelle e provocam lesões por «hyphas alongadas», ao encontro das *brachymycoses*. que se localizam tambem na tambem na pelle, mas provocam lesões por elementos curtos (βραχὺς).

Ambos pertencem ás familias das *Mycodermaceas*. Em nota, accrescenta o A., não se deve confundir o Genero *Mycoderma*, Persoon (1801), com os termos identicos latinos significando o véo formado pelas bacterias e cogumelos. Nas *Brachymycoses* ficam a *Torula mansoni*, Castellani 1908, os Aleurismas, um *Corethropsis*, um *Mycoderma — o hominis* e o *Schizosaccharomyces hominis*, Benedek. Vuillemin escreve e nelle inclue, uma nova especie de Aleurisma, que denomina *A. salmoneum* Vuill., 1929.

Ora, pelo que temos lido do assumpto, pensamos que a cousa não pode ser tão summaria como quer P. Vuillemin e muito menos si applicarmos a questão á classificação do *Oidium brasiliense*.

A historia do genero *Mycoderma* é das mais difficeis de fazer-se. A cada passo encontramos *Oidium, Geotrichum* e até *Monilia*.

A denominação *Mycoderma*, de μύκης fungo e δερμα = pelle— apparece, pela 1a. vez em Sciencia, no trabalho de Persoon, C. H. 1822. Myc. eur. s-1. pg. 96 «XLII. Mycoderma. Orbiculare, coniforme, primomole, sub-pellucidem dein induratum, substancia ubique aequali. (Asprum ? natura Mucedinnum).

Não dispensamos de repetir *pari passu* tudo que se póde desentranhar das bibliographias, pois, em resumo, R. Cifferri e P. Redaelli (An-

---

[7] Segundo, Langeron e Milochevitch — Epidermophyton floccosum (Hartz. 1820). Ann. de Parasit. I. Ocob. 1930, n. 5. Y. VIII. pg. 495.

[8] Idem, ibidem: Trichophyton concentricum.

nales Mycologici vol. XXVII, nº 3/4, 1929, pgs. 2-278) já disseram o bastante para vêrmos a difficuldade com que nos temos de haver, no estudo das Mycodermas. Citaremos, todavia, alguns pontos dos mais expressivos.

Não resta a menor duvida que Persoon não insulou uma especie. Elle reuniu, certamente, varios cogumelos, que *davam pelle,* vegetavam em certos liquidos. As interpretações posteriores é que foram, óra restringindo, óra alargando a concepção de Mycoderma. Basta dizer que um grupo de scientistas, até 1917, collocava ainda os Mycodermas entre as bacterias (C. E. A. Winslow e outros Preliminary Report, The families and genera of bacteries. The Journal of Bacteriology vol. II. p. 851-1917) e outro entre os fungos.

De 1920 para cá, parece que dominou este ultimo grupo, apenas com fundas divergencias do ponto da classificação mycologica e de definição dos mesmos. Foi Vuillemin que trouxe á baila novamente esta questão, achando que Demazières, 1826, havia precisado sufficientemente o typo mal descripto por Persoon, quando descreveu o aspecto do M. malti juniperinii «filamentibus simplicibus ramosijve subflexuosis non monilisformibus in pelliculam albam rugatam atertextis. Articuli secendentes in forma par-allelogrammi angulis rectis apice rotundatis. Supra maltum aquae-vitae juniperinii».

Nesse grupo, com esse typo, Vuillemin collocou numerosos cogumelos descriptos em outros generos.

Kützing (1834) já havia modificado a definição de *Mycoderma* de Demaziére. Will, em 1910, torna a retocal-o, dando novas directrizes ao Genero (Centrbl. f. Bakteriol. 2. XXVIII. pg. 1, 1910).

Guillermond, em 1924, collocou os *Mycodermas* entre os *Geotrichum* Link. Achou que o *Oidium Lactis* era synonymo de *Geotrichum candidum,* Link. *Mycodermas* e *Oidium,* para Guillermond, descriptos pelos medicos, deveriam ser incluidos naquelle genero.

Em 1928 (Clefs dichotomiques pour la détermination des levures pg. 78, nº 24) define *Mycoderma,* dizendo:

«*Leveduras* vegetando etc. e na pag. 29. «Aussi Vuillemin propose-t-il de conserver le genre *Oidium* pour la forme conidienne des *Erysiphacées* et d'incorporer l'Oidium lactis et les formes voisines de ce Champignon au genre *Mycoderme* (Persoon), dans le quel on avait confondu autrefois certaines Levures et l'Oidium lactis. Mais le terme Mycoderme est depuis longtemps employé par tous les biologistes qui s'occupent des Levures et des fermentations alcooliques, pour désigner les Levures asporogènes, végétants dans les liquides sous forme du voile. Il et impossible de détourner ce genre de son affectation définitivement consacrée et il est

regrettable qui á la suite de Vuillemin, la plupart des parasitologistes designent de ce nom des Champignons voisins de 1'0. lactis, ce qui entraîne les plus facheuses confusions. Nous croyons donc qu'il y a lieu de maintenir le genre Mycoderma dans son ancienne affectation et de ranger l'Oidium lactis et les Champignons voisins dans C. genre *Geotrichum* etc.».

Guillermond reporta-se tambem ao trabalho de Loubiére (Recherches sur quelques Mucédinées caséioles. Thèse doctorat. Paris. Sarbonne 1924), onde o *Oidium lactis* passa a ser synonymo de *Geotrichum candidum* —Link 1809, egual assim ao *Mycoderma lactis butiri* (Demazière 1826. Ob. botan. et zool. Lille et Ann. des Scien. Nat. vol. X. 1827) e M. multi juniperinii Demazière, 1827).

R. Ciferri e P. Redaelli (Ob. cit. nºs. 277 e 278) acceitam os dados de Guillermond e dizem:

«In conclusion, we hold that further an more accurante studies on this group of genera, which are still not clearly explained, are necessary, besides other bibliographical researches more profund than ours».

Mais adeante:

«As a conclusion to this most complicated history of the genera *Oidium, Mycoderma* and *Geotrichum,* we have to hold that generic name Oidium Link must be reserved for the ascomycetes of the family of the Erisyphaceae plant parasite; the name Mycoderma Persoon which included the species of Oidium pathogenous for man and animals and those according to the meaning given by Vuillemin, must be exchanged for the generic name Geotrichum Link, because it is most appropriate according to the International Rules of botanic nomenclature».

Como vemos, as ideas de P. Vuillemin, sobre os *Mycodermas,* não são universalmente acceitas. Vejamos agóra para o caso do *Oidium brasiliense.*

Para Vuillemin—*Mycodermas* são *Hyphomycetos, Thalloesporados, Arthroesporados,* considerando os *clamydoesporos* variedade de *Arthroesporos.* São cogumelos com mycelios mais largos que os microsiphonados (mais de 1 μ), sem conidios, com o thalo dissociavel em fragmentos, cortados a pique, arredondando-se ás vezes, podendo dar clamydoesporos. As culturas nos meios liquidos dão véo e nos solidos são como as das Leveduras.

Ora o *Oidium brasiliense* tem alguns desses caracteres e outros do outro grupo da classificação de Vuillemin. Elle possue elementos (vide ob. cit. Memorias Inst. Oswaldo Cruz, 1929 e 1918) que o deixam entre os blastoesporados, proximo das Monilias e Cryptococcus, ou talvez mais

longe, na familia das Proteomycetaceas. Os desenhos e microphotographias são expressivos bastante para dispensar commentarios. Ha, além desses, outros processos de multiplicação nos hospedes, já descriptos.

Mesmo acceitando as idéas de Vuillemin, o nosso aryzophyto não póde ficar entre as *Mycodermas*. Não póde tão pouco permanecer no genero com as idéas de Guillermond, para dizer que as *Mycodermas* são Levuduras. Não falamos nas lesões anatomo-pathologicas do *Oidium brasiliense,* que o afastam dos *Mycodermas*. Não queremos considerar pathognomonicas, para um cogumelo, essas lesões. Sabemol-as, num mesmo parasita, variabilissimas. Servem, comtudo, de meio auxiliar á systematica.

Haveria ainda uma questão de prioridade de nome dado ao parasita descripto por Splendor, em 1912 (Zynonema brasiliensis) e que Brumpt (ob. cit. pg. 1242, 1927) já havia designado, por uma emenda, como de *Mycoderma brasiliense*. Tão pouco *Mycoderma pulmoneum* já occupado pelo fungo de Bennett (1842), emend. Vuillemin 1891.

Pelas idéas de Guillermond, teriamos, pois, que collocar o nosso bolor no genero *Geotrichum* e veriamos *Geotrichum brasiliense* (*Oidium brasiliense,* O. Magalhães 1914). O Genero *Geotrichum* foi creado por Link, em 1809 (Observati. in ordines Plant. Natura. p. 17).

Saccardo (ob. cit. vol. 4, 1866, p. 39) diz Geotrichum Link obs. I. p. 53 (Etym. γῆ = terra et Τριχος = pellos):

«Hyphae steries repentes, fertilis, breves adscendents, septulatae. Conidia concatenata, breve cylindracea, utrinque truncata, hyalina».

Link, no artigo original, dizia: «sporidia magna extremi talibus truncatis genus designant».

As definições modernas que encontramos em Guillermond (obs. cit.) pg. 66 e em Ciferri e Redaelli (ob. cit. p. 279), differem ligeiramente. Os ultimos são mais pormenorizados, si bem que todos concordem num ponto na reproducção exclusiva pelos *arthroesporos*.

Para o 1º *Geotrichum* é um *Endomyces* sem ascos.

Para o 2º *Geotrichum* Link 1809 comprehende:

— *Oidium* Auct. pro maxima parte,
— *Mycoderma* Persoon, sensu Vuillemin
— *Oospora* Auct. por maxima parte.

TYPO: *Geotrichum candidum* Link, 1809, com a seguinte diagnose:

«Cellulas often elongated, cylindracal, in the form of small columns, or of rectangular shape with slightly rounded angles, with protoplasm, transparent, or vacuolated; generally united inslender chains at the ex-

tremity of articulated and ramified mycelial segments. Reproduction by arthrospores. Gigant colonies rather varied, generaly of Will's type I, do not ferment sugars, slight activity in the assimilation of carbohydrates».

O *Oidium brasiliense* não cabe nesta definição.

O genero *Candida* foi creado por Berkhout em 1923, para um conjuncto heterogeneo de fungos. Lá vemos *Monilias, Oidiums, Saccharomyces, Mycodermas,* etc.

A especie typo do genero é a *Candida candida* (Bon.) Berkhout (1923) (=*Monilia candida* Bonardon 1851=*Monilia* Bonardeni Vuillemin, 1911).

A diagnose do genero é a seguinte:

«Cellulas arredondadas, ellipticas, ovaes, apiculadas ou irregulares, unidas em cadeias acrogenicas, portadoras de sporophoros, geralmente ligeiramente apertadas nos apices, erectos ou rastejantes, blastoesporos usualmente presentes; mycelios septados ou ramosos, geralmente hyalinos; normalmente fermenta varios assucares, de accôrdo com a actividade das especies; hyphas rapidamente estereis, septadas».

Pelo que ahi fica dito o *Oidium brasiliense* não póde pertencer a esse grupo. E' inutil perder tempo com qualquer discussão mais pormenorizada.

Como vemos, estes Auctores, como os antigos, não se referem ás fórmas nos hospedes. Limitam-se quasi que ás encontradas nos meios artificiaes de culturas: justamente as que julgamos menos proprias para o estudo do cyclo do parasita. Tanto isso é verdade, que nos estudos aprofundados, procuramos fazer meios artificiaes proximos do *habitat* natural do cogumêlo. Ainda ha pouco, P. Vuillemin (ob. cit.). procurava dividir os *Mycodermas* parasitas de accôrdo *com o modo pelo qual se apresentavam nas lesões.*

Nem se deve argumentar achando-as fórmas de excepção.

Na phytopathologia são as fórmas dos hospedes que, em grande parte, decidem a questão.

Ha ainda as fórmas de «resistencia», semelhantes ás *dauerzellen,* descriptas por Will nas leveduras.

O *Oidium brasiliense* apresenta normalmente, em parasitismo, fórmas de perpetuação da especie tão dignas de registro como as de culturas artificiaes. E ou essas fórmas são exclusivas do mesmo cogumêlo e elle não pode ficar nesse grupo, ou, o que nos parece mais proximo da verdade, é commum a todos elles e não foram apuradas até hoje em muitos. Haja em vista o trabalho recente de Hergas e Cornwoell (ob. cit.) para algumas dessas fórmas, em cogumelo proximo ou deste grupo.

Recentemente o Sr. R. Ciferri, [9] retomando o *Proteomyces infestans*, de séde a principio incerta e, após os estudos de Olympio da Fonseca, [10] incluido entre os *Mycodermas*, prefere, pela analyse que fez, das figuras de Moses e Vianna e das observações macro e microscopicas das culturas, conservar o genero *Proteomyces*.

As differenças com *Geotrichum* são pequenas. Todos, aliás, ficam entre as Torulopsidaceae, super familia da Adelosaccharomycetaceae.

Neste trabalho Ciferri modifica já a definição do Genero *Geotrichum*, que dera em trabalho anterior, com Redaelli.

O *Oidium brasiliense* tambem não póde ficar neste genero.

Basta ler as nossas descripções e comparar as fórmas microscopicas de ambos.

Está comtudo, proximo.

Nos «Annales Parasitologie» de 1932 [11] o Sr. M. Langeron e R. V. Talice fizeram novo estudo aprofundado dos cogumêlos levuriformes, revendo as respectivas classificações e propondo mais uma chave para a systematica desses fungos. Nosso trabalho sobre a classificação do Oidium brasiliense é anterior a esse. Elle foi terminado e entregue para publicação em 31 de Dezembro de 1931.

Em 16 de Janeiro de 1932 fizemos, em São Paulo, na Sociedade de Medicina e Cirurgia [12], uma conferencia em a qual foi estudado o novo genero.

Mesmo que assim não fosse é nosso desejo mostrar que o genero «Neogeotrichum» deve persistir em face dessas novas pesquizas.

Langeron e Talice basearam a nova classificação em elementos puramente morphologicos. Fizeram o estudo da morphologia do apparelho esporifero dos cogumêlos.

Os autores excluem o termo Monilia da nomenclatura dos cogumêlos levuriformes. Limitam os estudos ás «Mycotorulaceas», isto é, «aos cogumêlos levuriformes propriamente ditos, não pigmentados e possuindo um apparelho filamentoso e esporifero».

Os auctores comprehendem este grupo como Ciferri e Redaelli o descreveram.

As Mycotorulaceas são «Thaloesporados» como o definiu P. Vuillemin.

---

[9] Contribuzioni alla sistematica delle Torulopsidaceae. Arch. fur Protistenkunde — 1930. 71 Band. Heft 3, pg. 405.

[10] Olympio da Fonseca Filho — 1929. Bol. Acad. Nacional de Medicina 6:225, Maio, 23. Classificação do agente da Proteomycose.

[11] Annales de Parasitologie 1er. janvier 1932 To. X, n. 1, pg. 1.

[12] Semana de Laboratorio 11 a 17 de janeiro de 1932, São Paulo.

Elles ficam entre os «Blastoesporados» e destes no grupo dos Torulopsidaceas creado por Ciferri e Redaelli.

A sub-familia das Mycotorulaceas é dividida em 6 generos comprehendidos em 2 grupos. O primeiro, de cogumêlos cujas culturas gigantes são crêmosas, o segundo, aquelles de culturas membranosas.

Só nos interessariam as especies dos 6º genero e o respectivo annexo, isto é, o 2º grupo.

Os outros generos como por exemplo o 5º (Blastodendrion) têm alguns elementos do nosso fungo; não têm, porém, todos.

Pela definição dada pelos auctores aos generos Geotrichoides e Geotrichum vemos logo que em nenhum delles podemos encaixar o nosso fungo.

O *Oidium brasiliense* é um cogumelo mais elevado e apresenta os seguintes caracteres:

1) Arthroesporos (parallelogrammicos, muitos);
2) Blastoesporos - Levedura classica, ovoide ou espherica (cortes) e certas culturas.
   Leveduras ellipticas (escarro), com ou sem duplo contorno. Algumas dessas formas lembram, quando localizadas no coração e pulmão, as do *coccidioides immitis*.
3) Fórmas de resistencia, «em mosaico», semelhantes ás das leveduras.
4) Mycelio óra hyalino, septado, terminando e partindo-se em arthroesporos e blastoesporos, óra fino, delgado, com 1 μ de tamanho, irregular e sem septos, não raro reunidos em hyphas aéreas;
5) Fórmas pseudo actinomycoticas;
6) Fórmas «bacillares» e *em navette*. As primeiras oriundas de kystos especiaes.
7) Fórmas coccaceas;
8) Cellulas de resistencia, semelhantes ás descriptas por Will nas leveduras.
9) Cellulas de resistencia, semelhantes ás de endoesporulação do *coccidioides immitis*, o que faria pensar na familia da *Proteomycetaceae*;
10) Esporos irradiantes, como se vê no *Coccidioides immitis*.
11) Cresce bem nos meios liquidos, formando pellicula;
12) Cultura nos meios artificiaes, solidos, rapida e cerebriforme, secca, pennujenta ás vezes, cheias de espiculas e após humida;

13) Fermenta os assucares;

14) Tem grande poder pathogenico para os animaes de laboratorio (coelhos, cobayas, ratos, camondongos, saguis, micos) e homem, perdendo com as repicagens.

15) A reacção dos tecidos caracteriza-se:
1) Cellulas epitheliodes.
2) Reacção lymphocytaria.
3) Reacção de polymorpho nucleares de neutrophilos e eosinophilos.
4) Fócos hemorrhagicos até em lençol.
5) Infiltração perivascular pelos monolobados.
6) Tecido conjunctivo de inflammação.

16) Produz, nos organismos dos animaes, e do homem infestados, anti-corpos especificos. (Reacção de Bordet-Gengou applicada).

HABITAT: Intestino humano e dahi, provavelmente baixando a resistencia individual, se localiza no pulmão.

Com esses caracteres propomos a creação do novo genero *Neogeotrichum* n. g.

ESPECIE TYPO: *Néogeotrichum pulmoneum* (O. Magalhães, 1914). emend. O. Magalhãees, 1931.

=*Oidium pulmoneum* (O. Magalhães, 1914).

=*Oidium brasiliense* (O. Magalhães, 1914).

=*Monilia brasiliense* (Brumpt e Langeorn, 1922).

=*Mycoderma brasiliense* (O. Magalhães, 1923) Bolognesi e Chiurco, 1927.

Geotrichum brasiliense (Ciferri e Redaelli, 1929).

=*Candida brasiliense* (Waldemar Bargal, 1931).

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXXVI—XL

Desenhos.

Cultura em cenoura. Lactophenol.

A

Nº 1—Cellula resistente.
» 2—Esporos irradiantes (Ocular 18, Zeiss, Objectiva 8, Leitz). Germinação multipla.
» 3—Esporos irradiantes.
» 4—Cellula resistente, typo do desenho *B* Nºs. 1 e 2, germinando. Elementos bacillares. Fenda lateral dupla.

B

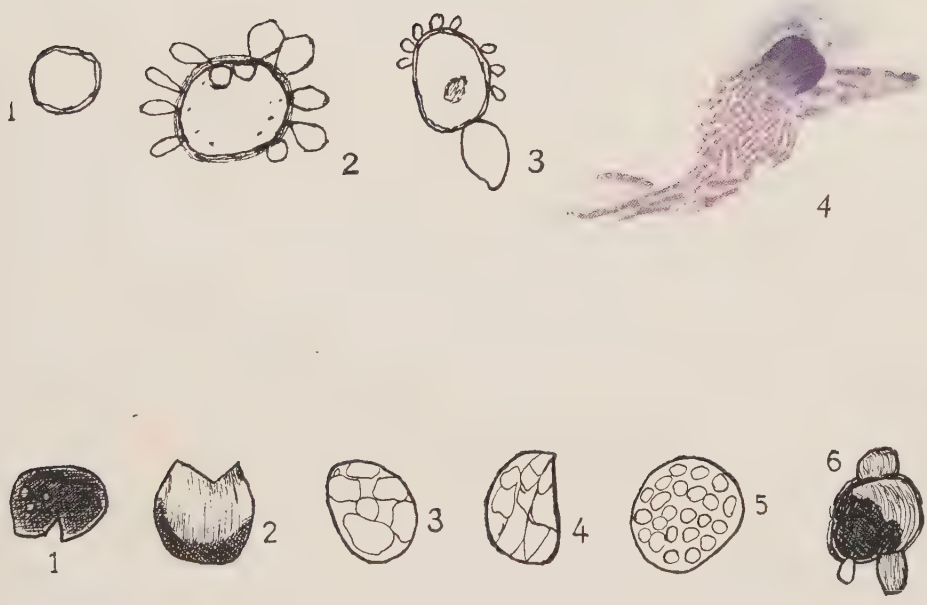
Cultura em lamina secca. Sublimado-alcool-Giemsa.
Ocular 18 — Zeiss. Objectiva Leitz.

Nº 1—«Cellula de resistencia». Fenda lateral da capsula.
» 2—Cellula de resistencia. Chromatina condensada num polo. Fenda lateral.
» 3—Cellula gigante.
» 4—Cellula gigante.
» 5—Endosporulação.
» 6—Cellula typo Will.

C

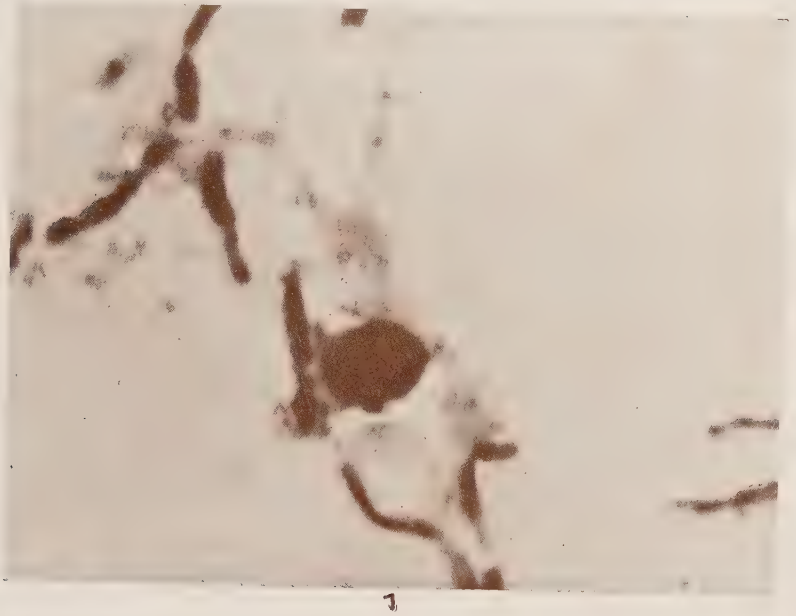
Microphotographias.

Nº 1—Cellula resistente. Condensação maior da chromatina num polo. (1.840 vezes).
» 2—Cellula resistente, typo do desenho *B* Nºs. 1 e 2, germinando. Elementos bacillares. Fenda lateral dupla. (1.840 vezes).
» 3—Elementos bacillares oriundos da cellula precedente já livres e desenvolvidos. (1.840 vezes).
» 4—Cultura em cenoura. Dominam as fórmas de resistencia.
» 5—Cellulas de resistencia. Ainda não ha differenciação no protoplasma.
» 6—Cellulas de resistencia. Inicio de formação dos esporos internos. Note-se o duplo contorno destes.
» 7—Cellulas de resistencia. Endoesporulação.
» 8—Cellulas de resistencia. Endoesporulação.
» 9—Esporos irradiantes.

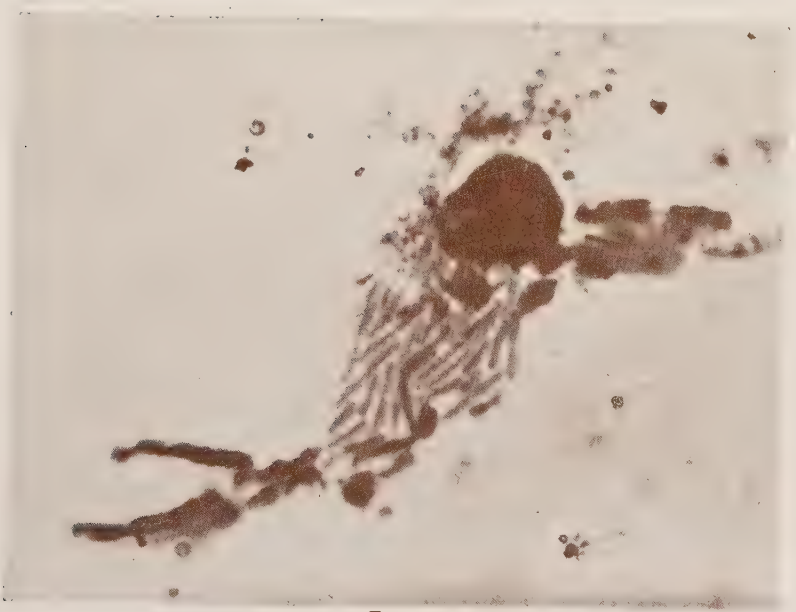


O. M. DEL.

Dr. Octavio de Magalhães : A Classificação do *Oidium brasiliense.*



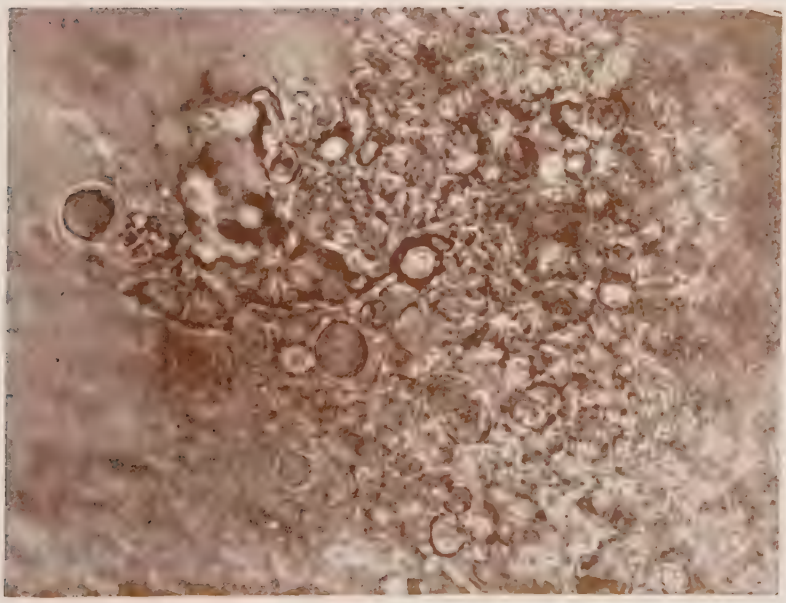
1



2

Dr. Octavio de Magalhães: A Classificação do *Oidium brasiliense.*

3



4

Dr. Octavio de Magalhães : A Classificação do *Oidium brasiliense*.

5

6

7

Dr. Octavio de Magalhães : A Classificação do *Oidium brasiliense.*

8

9

Dr. Octavio de Magalhães: A Classificação do *Oidium brasiliense*.

Investigações sobre doenças de Psittacideos (*)

por

GENESIO PACHECO

(Com 1 graphico no texto e as estampas XLI — XLIV)

I—INTRODUCÇÃO

Continuando nossas investigações sobre doenças de papagaios, iniciadas ha cerca de um anno e em parte já publicadas, conseguimos obter na segunda metade de 1930 um lote de 50 aves, *Amazona aestiva,* o que nos permittiu avançar os nossos conhecimentos sobre as doenças anteriormente descobertas e estudadas por nós nesses animaes, em collaboração com nosso companheiro de trabalho Otto Bier.

Nas investigações até então realizadas fôra por nós estabelecido que, sob o nome de *psittacose dos papagaios,* eram confundidas varias doenças destes animaes, de etiologia diversa, embora com symptomas e alterações anatomicas confundiveis.

De facto, eram communs na symptomatologia, tristeza, inappetencia, diarrhéa sanguinea ou exangue; no exame necroscopico, congestão e entumescimento das visceras abdominaes, ecchimoses nas serosas e pequenos nodulos necroticos situados no baço, rins e principalmente no figado.

O grande alarde que acompanha a *psittacose,* recebida com certo quê de mysterio e horror, o seu desapparecimento em pouco tempo, e o facto de se tratar de doença facilmente transmissivel ao homem, deixaram sempre obscuros não só a sua etiologia como as suas relações com os papagaios. Isto deve ter concorrido para a imperfeição do seu conhecimento e a natural confusão resultante da sua incompleta observação.

Duas particularidades são interessantes de assignalar na apparente semelhança da *psittacose* com as outras doenças referidas. Uma é que no estudo da *psittacose humana* de ordinario não se preoccuparam os investigadores com a doença animal; este deslise contribuiu muito para a ignorancia da natureza da *psittacose* até a ultima epidemia.

A outra particularidade é que nem sempre a doença dos papagaios se transmittiu ao homem como referem Wolff, (apud Leichtenstern),

(*) Recebido para publicação a 26 de Janeiro de 1932.

Greene, que entretanto assignalou a permanencia do agente infectante nas gaiolas onde morreram papagaios durante annos, e outros.

Da inobservancia de estudo detalhado entre relações de epizootias e epidemias de *psittacose* tem resultado o pouco que se sabe do assumpto na parte referente aos papagaios. O facto é tanto mais interessante de notar quanto são estes animaes a fonte da doença que se propaga ao homem.

Em trabalho anterior, já assignalámos que sob o nome de *psittacose* existia nos papagaios mais de uma doença: de uma epizootia conseguimos isolar uma bacteria, do mesmo genero que a isolada por Nocard, a *Salmonella psittacosis*, mas não identica a ella; de dois papagaios doentes, adquiridos num vendedor de aves, isolámos um virus, com propriedades differentes do virus isolado na Europa e na America do Norte; além disso, isolámos de papagaios de outras fontes, o germen de Nocard.

Proseguindo no estudo das propriedades desses tres agentes pathogenicos, visto não termos conseguido obter o *virus* transmissivel ao homem, vamos no presente trabalho expôr os resultados conseguidos.

II—ESTUDOS SOBRE O VIRUS

Natureza do virus.

Em estudo anterior haviamos verificado que o *virus* por nós isolado pertencia ao grupo dos *virus* filtraveis, isto é, atravessava filtros capazes de reter as bacterias de prova. No material infectante, emulsão de figado ou de baço e nos liquidos das serosas dos animaes mortos, não conseguimos observar, quer em campo escuro quer por meio de colorações finas (observação a fresco em campo escuro, coloração de cilios, impregnação, coloração de Giemsa), a presença de elementos microbianos. O nosso *virus* exhibe ainda outras propriedades que o incluem neste genero de agentes infectantes: soffre influencia de agentes physicos e chimicos, conserva-se nos orgãos dos animaes mortos por elle, reproduz a doença em serie, age em altas diluições, transmitte-se por contagio e produz inclusões nas cellulas dos orgãos de animaes atacados por elle.

Passaremos em revista as propriedades estudadas e os resultados obtidos.

Acção dos agentes physicos e chimicos

Não dispondo de numero muito grande de animaes sensiveis, procurámos provar a influencia de substancias ou agentes mais frequentemente utilizados como desinfectantes: sabão, lixivia de soda, leite de cal, alcool e calor.

O quadro I refere os protocollos das experiencias e os seus resultados.

QUADRO I

Acção de agentes physico-chimicos sobre o virus.

Nome do papagaio que forneceu virus	Data da experiencia	Substancia empregado	Condições	Tempo de duração	Animal de prova	Resultado
Ao	10-10-30	Alcool ethylico diluido a 50 o/o	Virus fresco distendido sobre lamina em camada fina, deseccado ao ar e coberto com a substancia. Após a acção do alcool foi este escorrido e o esfregaço secco em estufa a 37º durante meia hora.	10 m.	Papagaio Bg. (inoculado p. o. e i. p.)	Adoeceu em 14 e morreu em 15-10-30, com lesões typicas de doença de virus.
Bu	15-11-30	Alcool puro do commercio (42º)	Identicas ás precedentes	15 m.	Papagaio Cv (inoculado) p. o. e i. p.)	Não adoeceu.
Ao	10-10-30	Calor a 55ºC.	Emulsão de figado fechada em empola de vidro e mergulhada em banho-maria.	10 m.	Papagaio Bh (inoculado p. o. e i. p.)	Adoeceu em 14 e morreu em 17-11-30, com lesões typicas de virus.
Ao	10-10-30	Calor a 65ºC.	Identicas ás precedentes	10 m.	Papagaio Bl (inoculado p. o. e i. p.)	Não adoeceu.
Bq	23-11-30	Agua de sabão de lavar roupa a 10 o/o (alcalinidade 0,33 o/o)	Emulsão de figado, contacto em tubo, centrifugado, lavado e reemulsionado em agua physiologica.	5 m.	Papagaio Cb (inoculado p. o. e i. p.)	Não adoeceu.
Bq	26-11-30	Leite de cal.	Identicas ás precedentes	12 m.	Papagio Ce (inoculado p. o. e i. p.)	Não adoeceu.
Bq	26-11-30	Leite de cal.	Identicas ás precedentes	5 m.	Papagaio Cf (inoculado p. o. e i. p.)	Morreu em 8-12-30, com lesões typicas de doença de virus.
		Soda a 1 o/o	Identicas ás precedentes	5 m.		Não adoeceu.
		Soda a 1 o/o	Identicas ás precedentes	10 m.		Não adoeceu.

A technica usada foi a seguinte:—figado [1] de papagaios, mortos pelo virus no dia da prova, era espalhado em camada fina sobre lamina de vidro e rapidamente desseccado ao ar. A lamina era em seguida mergulhada no liquido cuja acção se queria provar. Retirada depois do tempo desejado era posta a seccar na estufa a 37° pelo espaço de meia hora. Raspado o material, era emulsionado em gral esteril, em solução de normosal e injectado em papagaios não inoculados anteriormente com virus. Nas experiencias com leite de cal, agua de sabão e solução de hydrato de soda procedemos por centrifugação. Em todas as provas negativas era verificado que o virus fôra a causa da morte do animal que o fornecera, não sómente pelas verificações necroscopicas como tambem pelo exame histologico.

Submettido á acção do alcool diluido, manteve-se o *virus* perfeitamente infectante após contacto de 10 minutos; entretanto o mesmo não se deu com o alcool puro (42° do commercio), que o destruiu em 15 minutos. Sob a acção do calor o virus supportou a temperatura de 55°C., mas ficou inactivado a 65°, no tempo de 10 minutos.

O leite de cal destruiu o virus em 12, mas não o fez em 5 minutos. Igualmente rapida foi a acção dos alcalis (sol. de hydrato de soda ou agua de sabão alcalino), que o mataram em 5 minutos.

Parece-nos que esses resultados têm importancia pratica consideravel na orientação de uma prophylaxia facil e accessivel do material contaminado.

Obtivemos resultados interessantes sujeitando o nosso *virus* ao desseccamento, como se póde apreciar nas experiencias abaixo:

Maitaca Bi [2] 10-10-30—inoculada i. p. com 0.1 gr. de figado do papagaio Ag, desseccado e conservado no laboratorio em placas de Petri, exposto a luz, durante 16 dias. Não adoeceu.

Papagaio Ao [3] 30-7-30—inoculado com mistura de fezes e figado do papagaio Ae, desseccado nove dias antes (21-7-30) e conservadas na geladeira, ao abrigo da luz. Entristeceu no segundo dia após a inoculação e se manteve mais ou menos assim até 3-10-30, quando foi provado com virus (figado) do papagaio Aff, conservado sob glycerina (meio de Bedson), [4] havia 32 dias. Adoeceu no terceiro dia e morreu 4 dias depois com lesões typicas.

[1] Como fonte de virus usámos quasi sempre figado de papagaios mortos da doença typica e conservado em tubo de vidro neutro com liquido de Bedson.

[2] — *Aratinga cactorum.*

[3] — Sempre que nos referimos a papagaio trata-se da *Amazona aestiva.*

[4] — Mistura de partes iguaes de glycerina e solução 1/25 N de phosphato de sodio.

Papagaio Br 14-10-30—inoculado i. p. e p. o. com emulsão de figado do papagaio Ag, desseccada e conservada a 3 dias no laboratorio, exposta á luz, em placas de Petri. Adoeceu a 15 e morreu a 16-10-30 com doença typica.

Papagaio Cg 29-10-30—inoculado i. p. e p. o. com emulsão de figado do papagaio Ao, desseccada e conservada na geladeira, ao abrigo da luz durante 20 dias. Não adoeceu.

Papagaio Ch 3-11-30—inoculado com *virus* secco (figado) do papagaio Ag que serviu para o papagaio Br (datando de 39 dias). Entristeeceu no terceiro dia, mas melhorou pouco a pouco, havendo emmagrecido. Em 14-11-30 recebeu virus do papagaio Ag, conservado na geladeira ao abrigo da luz, datando de 1 mez. Adoeceu no dia seguinte e morreu no 3º dia, apresentando á autopsia alterações congestivas no intestino e nada mais. O exame encontrou no figado lesões discretas de doença bacteriana e não encontrou lesões da doença do virus.

Papagaio AN 1 4-10-30—inoculado i. p. com 0,02 de *virus* da maitaca Bi, conservado secco desde 6 dias. Não adoeceu.

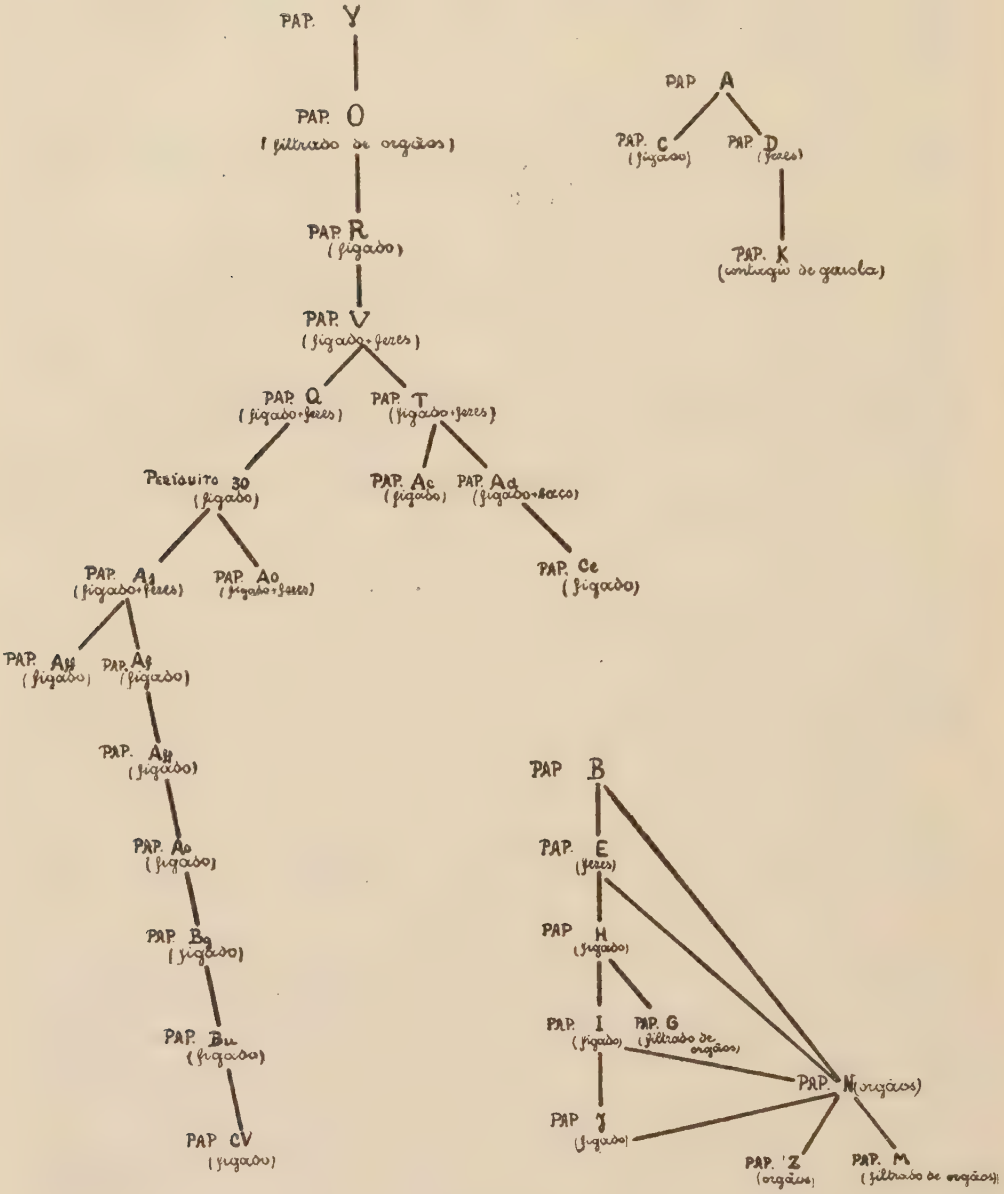
Papagaio Ao—inoculado i. p. e p. o. com virus do papagaio Ae, desseccado e conservado na geladeira, ao abrigo da luz durante 9 dias. Não adoeceu.

Finalmente, em 14-12-30, inoculámos 2 papagaios, Br e Ce, com *virus* do papagaio An 1, conservado secco desde 3 dias em placa de Petri esteril, na mesa do laboratorio. Sómente Br adoeceu no segundo dia e morreu no 5º, com lesões typicas da doença do virus.

A protecção contra a acção do ar não favoreceu a acção degradadora do desseccamento: virus do papagaio Ao, desseccado rapidamente e fechado no vacuo, mantido em vidro neutro e conservado na geladeira, ao abrigo da luz, durante 30 dias, foi inoculado p. o. e i. p. no papagaio Cd, sem lhe alterar a saúde.

Sujeito á desseccação, pois, o *virus* perdeu rapidamente a sua actividade. Desseccado e conservado no laboratorio, exposto á luz diffusa, infectou com 3 dias mas com 6 dias se tornou inocuo.

O mesmo foi observado com a prova de inoculação, após 9 dias de conservação na geladeira e ao abrigo da luz.


PAP. Y
PAP. O
(filtrado de orgãos)
PAP. R
(figado)
PAP. V
(figado-fezes)
PAP. Q
(figado-fezes)
PAP. T
(figado-fezes)
Periquito 30
(figado)
PAP. Ac
(figado)
PAP. Ad
(figado-baço)
PAP. Ce
(figado)
PAP. A1
(figado-fezes)
PAP. Ao
(figado-fezes)
PAP. A11
(figado)
PAP. A8
(figado)
PAP. A11
(figado)
PAP. Ao
(figado)
PAP. Bg
(figado)
PAP. Bu
(figado)
PAP CV
(figado)
PAP A
PAP. C
(figado)
PAP. D
(fezes)
PAP. K
(embrião de galinha)
PAP B
PAP. E
(fezes)
PAP H
(figado)
PAP. I
(figado)
PAP. G
(filtrado de orgãos)
PAP. N (orgãos)
PAP J
(figado)
PAP. Z
(orgãos)
PAP. M
(filtrado de orgãos)

Passagem em serie

O graphico junto reproduz o numero de passagens do nosso *virus*, isolado em começo de 1930. [5] A sua actuação tem sido constante e tem produzido nos animaes sempre as mesmas alterações. A transmissão póde se dar por contacto directo, mas não é muito facil. Maitacas (*Aratinga cactorum*) e periquitos (*Psittacula passerina*) não inoculados, foram deixados em contacto na mesma gaiola com aves da mesma especie inoculadas com *virus*. Apezar de assim collocadas, no mesmo dia em que estas foram inoculadas, não adoeceram. Provados depois, todos se revelaram sensiveis ao *virus*.

O contagio directo, entretanto, se deve dar porque os papagaios quando juntos têm o habito de coçarem ou acariciareem uns aos outros e além disso contaminam a alimentação com as dejecções. Anteriormente já viramos que o *virus* infecta muito por via oral. Não é porém muito facil esse contagio como se vê na experiencia seguinte: Papagaio An 1 foi inoculado com *virus* do papagaio Bq em 6-12-30 e na mesma gaiola collocou-se o papagaio Br. An 1 teve doença typica e Br não adoeceu. Ajuntou-se á sua gaiola em 14-12-30, o papagaio Ce, inoculado com *virus* do papagaio An 1. Não adoeceu, apezar de ter-se evitado praticar limpeza da gaiola.

Em outra experiencia haviamos verificado a fraca contagiosidade da doença pela proximidade: mantivemos o papagaio Bo, entre duas gaiolas contendo papagaios doentes (By e Bj), durante toda a evolução da doença destes animaes, sem ter aquelle adoecido. Mais tarde, após a morte dos papagaios doentes, outras aves infectadas foram approximadas de sua gaiola, ainda sem resultado. Não obstante, é incontestavel a possibilidade do contagio, porque o *virus* se transmitte facilmente pela bocca, fazendo ingerir fezes de papagaios doentes.

Procurámos verificar tambem a possibilidade da transmissão do *virus* por intermedio de ectoparasitos: 1) Papagaio Cw, inoculado com virus do papagaio Cf, foi introduzido numa gaiola contendo numerosos *Aedes* (*Ochlerotatus*) *serratus*, [6] *A.* (*Och.*) *scapularis* e *Psorophora sp.*, apanhados na matta. Após a morte de Cw, que teve doença typica, desinfectou-se a gaiola com alcool e passou-se para ella o papagaio Da. Não adoeceu até morrerem quasi todos os mosquitos. 2) Papagaio Bo, com doença inicial, foi picado por numerosos *Culex quinquefaciatus* e *Aedes*

---

[5] O numero de passagens tem continuado, para manutenção do virus, até Agosto de 1931, quando escrevemos este trabalho.

[6] A determinação destes mosquitos foi feita amavelmente pelo dr. Oliveira Castro que ainda forneceu os especimens utilisados e acompanhou estas experiencias.

(*Ochlerotatus*) *sp.*, creados em laboratorio. Passou-se para sua gaiola, após a morte, o papagaio Cb, que não adoeceu. 3) Ainda outra experiencia identica foi feita com o papagaio Pd, tambem sem resultado positivo.

Nessas experiencias os mosquitos não eram alimentados na vespera e foram vistos picar a ave doente e a sã.

Actividade do virus

Proseguindo nas verificações do limite da actividade do *virus*, obtivemos infecção com dóses inferiores ás obtidas anteriormente, como se póde ver no quadro nº II, comparativo da sensibilidade á via de inoculação. Conseguimos infectar na diluição até de 1:100.000, isto é, com 0,00001 gr. de figado, limite maximo então experimentado.

Em outra experiencia, para verificar a distribuição de *virus* no organismo animal, conseeguimos infecção com 0,000002 gr. de material virulento, isto com diluição de 1:500.000. A technica usada para a prova foi a de pesada de 1 gr. de figado de animal doente e morto no dia mesmo da experiencia, diluido em 9 c.c. de solução de normosal, partindo desta emulsão mãe para as outras diluições seguintes. A infecção se deu sempre com o tempo regular de incubação e evolução.

Sensibilidade das vias de inoculação

Procurámos comparar a sensibilidade das vias oral e peritoneal ao *virus*, para confirmar verificações anteriores e completal-as. Diluições successivas de uma amostra de *virus* foram inoculadas pelas duas vias, oral e peritoneal, em animaes differentes, no mesmo dia e hora. Encontra-se no capitulo anterior a technica da preparação das diluições (v. quadro II).

A via peritoneal revelou uma sensibilidade muito maior que a via oral. Esta não permittiu infectar mais o animal a partir de 1:50.000 e a via peritoneal produziu doença até 1:100.000, diluição maxima utilisada.

Repetimos a experiencia da penetração pela pelle, desplumando a pelle da cabeça do papagaio Ce e cobrindo a parte desplumada com emulsão de figado do papagaio Cb. Com esta pratica procurámos corrigir a objecção de experiencia referida em outra publicação, pela escarificação e deposição de *virus* feita na pelle desplumada do corpo de um papagaio, coberta com esparadrapo, que poderia ter sido tocada pelo bico do animal.

Na experiencia actual essa possibilidade ficava afastada. O animal adoeceu 3 dias após e morreu no 7º dia, apresentando lesões typicas da doença. No local inoculado não existiam alterações pathologicas.

QUADRO II

Sensibilidade das vias de inoculação e actividade do virus.

Papagaio numero	Material	Via	Diluição	Data	Adoeceu	Morreu	Observações
Bm	Figado do papagaio Bu	i. p.	10.000	15-11-30	19-11-30	22-1 -30	Lesões typicas.
By	Figado do papagaio Bu	p. o.	10.000	15-11-30	19-11-30	21-11-30	Lesões typicas.
Bq	Figado do papagaio Bu	i. p.	50.000	15-11-30	19-11-30	23-11-30	Lesões typicas.
Bx	Figado do papagaio Bu	p. o.	50.000	15-11-30			Não adoeceu.
Cu	Figado do papagaio Bu	i. p.	100.000	15-11-30	19-11-30	22-11-30	Lesões typicas.
Ct	Figado do papagaio Bu	p. o.	100.000	15-11-30			Não adoeceu.

Por essa occasião inoculámos por via ocular o papagaio Cc, com o mesmo material, depositando sobre a cornea uma pequena gotta da emulsão que servira á inoculação cutanea do papagaio Cb. Adoeceu como aquelle e morreu dois dias mais cedo que elle. Foram encontradas á autopsia lesões typicas da doença.

Distribuição do virus no corpo do animal

Para esta prova foi tomado um lote de maitacas (*Aratinga cactorum* Wied), animaes que, em experiencias anteriores, mostram-se sensiveis ao *virus*. As aves foram distribuidas em grupos de 4 em cada gaiola e recebia cada grupo a mesma diluição. Utilizou-se como fonte de *virus*, figado fresco do papagaio Cu, que serviu á prova de diluição de *virus* (v. quadro III).

Deste animal foram preparadas diluições de cerebro, figado, baço e fezes, seguindo a mesma technica das provas anteriores.

As injecções foram sempre intraperitoneaes, verificada ser a via mais sensivel. Duas aves morreram no segundo dia, provavelmente de choque, pois que não apresentaram lesões necroscopicas e histologicas da doença. O cerebro não revelou a presença do *virus*, na diluição de 1:1.000, minimo usado; as fezes só infectaram até esta diluição; o baço e o figado foram os orgãos que se mostraram mais ricos em virus, infectando até na dóse de 0,0000020 gr., (diluição 1:500.000).

Viabilidade do Virus

Assignalámos em outro capitulo que o *virus* era destruido por agentes physicos e chimicos, incluindo o desseccamento. Em trabalhos anteriores entretanto, verificaramos que, protegido do desseccamento, em soluto glycerinado, a conservação prolongava-se por largo tempo.

Continuámos as observações neste sentido, contando inoculações positivas com virus conservado em liquido de Bedson, após 70 dias. Eis os protocollos das experiencias:

Papagaio Bi—inoculado em 10-10-30 com virus [7] do papagaio Aj, conservado na geladeira em glycerina desde 70 dias. Adoeceu a 14 e morreu a 18-10-30, apresentando lesões cadavericas e histopathologicas typicas.

[7] Sempre que nos referimos a *virus* trata-se de figado de animal morto da doença.

QUADRO III

Distribuição do virus no organismo animal.

Diluição	Data	Doença	Morte	Observações
CEREBRO				
1.000	22-11-30			Não adoeceu.
10.000	22-11-30			Não adoeceu.
50.000	22-11-30			Não adoeceu.
100.000	22-11-30			Não adoeceu.
500.000	22-11-30			Não adoeceu.
FIGADO				
1.000	22-11-30	24-11-30	28-11-30	Lesões typicas.
10.000	22-11-30	24-11-30	27-11-30	Lesões typicas.
50.000	22-11-30	24-11-30	27-11-30	Lesões typicas.
100.000	22-11-30	24-11-30	27-11-30	Lesões typicas.
500.000	22-11-30	24-11-30	30-11-30	Lesões typicas.
FEZES				
1.000	22-11-30	23-11-30	28-11-30	Lesões typicas.
10.000	22-11-30		24-11-30	Choque ?
50.000	22-11-30			Não adoeceu.
100.000	22-11-30			Não adoeceu.
500.000	22-11-30			Não adoeceu.
BAÇO				
1.000	22-11-30			Estes adoeceram com os mesmos symptomas e morreram no mesmo tempo que os inoculados com figado mas perderam-se as notas com indicações sobre elles.
10.000	22-11-30			
50.000	22-11-30			
100.000	22-11-30		24-11-30	Choque ?
500.000	22-11-30		1-12-30	Sem lesões e sem doença apparente.

Papagaio Bk—recebeu em 10-10-30 mistura do *virus* dos periquitos (*Psittacula passerina*) n. 27, conservado na geladeira sob glycerina havia 90 dias e n °30, conservado havia 87 dias. Não adoeceu. A 5 de 11 foi provado com virus proveniente do papagaio Aff, mantido havia 68 dias sob glycerina, na geladeira. Adoeceu a 10 e morreu a 11-11-30, apresentando lesões macroscopicas e histologicas typicas da doença de virus. Como se vê, o virus se conserva bem nas condições exaradas acima, até 2 mezes ou pouco mais (70 dias).

Deve estar proximo deste praso o limite de sua durabilidade, porque com 90 dias já não foi capaz de infectar um animal que se mostrou sensivel á prova com um virus de 68 dias, inoculado logo depois.

Immunidade

Experiencias anteriores, já publicadas e outras que realizámos depois, inoculando *virus* attenuado pelo desseccamento ou após longa conservação, aproveitando os animaes que não adoeciam ou adoeciam ligeiramente, em consequencia dessas inoculações, não trouxeram evidencias de uma immunidade adquirida. Alguns animaes foram inoculados com material nessas condições repetidas vezes, sem que resultasse das reinoculações qualquer immunização. Foi o que observamos com o Papagaio Br que recebeu 3 vezes *virus* desseccado e conservado na geladeira durante tempo cada vez mais curto: em 16-10, 3-11, 24-11 e 13-12 de 1930. O primeiro material inoculado datava de 22 dias e o derradeiro de 3 dias. Este, infectou e matou o animal em 3 dias, com doença typica.

Doença experimental

As alterações produzidas pelo *virus* na saúde dos psittacideos, particularmente nos de genero *Amazona,* são de molde a crear uma doença especial, cujos caracteristicos merecem ser fixados minuciosamente.

PERIODO DE INCUBAÇÃO—Reunimos no quadro IV o tempo de incubação observado em 12 papagaios inoculados com *virus* não attenuado anteriormente por substancia ou por acção alguma. Foi encontrado maior numero de vezes o tempo de 2 a 4 dias como periodo incubatorio.

QUADRO IV

Tempo de incubação da doença de virus.

Nome do papagaio	Data da inoculação	Tempo de incubação
M	26-3-30	2 dias
N	20-3-30	5 «
O	2-4-30	6 «
Z	28-3-30	3 «
P	2-4-30	3 «
Q	12-5-30	3 «
V	5-5-30	2 «
T	12-5-30	2 «
U	12-5-30	3 «
Ao	3-10-30	3 «
Bg	10-10-30	4 «
Bu	7-11-30	4 «
Bm	15-11-30	4 «
By	15-11-30	4 «
Bq	15-11-30	2 «
Co	9-1-31	1 «
Br	13-12-30	2 «
Ce	18-2-31	4 «
Cc	18-2-31	4 «

Naquelles casos em que foi inoculado *virus* de algum modo attenuado ou usada uma via de menor sensibilidade, como a via oral por exemplo, este tempo prolongou-se até uma semana. Aqui está, para justificação, o protocollo do papagaio Bk, que fôra inoculado em 10-10-30 com mistura de figado dos periquitos 27 e 30, contando 87 e 90 dias de conservação, respectivamente, sem resultado e que, recebeu depois, por via oral, *virus* do papagaio Aff, em 5-11, conservado 65 dias sob glycerina. Este animal adoeceu em 11-11-30, 6 dias portanto depois da administração do *virus*.

EVOLUÇÃO—Da mesma maneira que a incubação, é rapido o transcorrer da doença. Uma vez o animal doente—inappetente, triste e arrepiado, morrerá infallivelmente em poucos dias. A principio, a actuação do *virus* não era tão regular e as alterações cadavericas eram menos accentuadas. Observámos a duração de uma semana e mais na evolução da doença. Depois o prazo tornou-se uniforme, de 2 a 3 dias, poucas vezes menos, poucas vezes mais.

QUADRO V

Tempo e evolução da doença de virus.

Nome do papagaio	Data da doença	Data da morte	Duração
K	4-4-30	8-4-30	4 dias
M	28-4-30	9-4-30	12 «
N	20-3-30	26-3-30	6 «
O	2-4-30	9-4-30	7 »
Z	31-3-30	2-4-30	2 »
Y	26-3-30	2-4-30	7 «
P	5-4-30	6-4-30	1 »
Q	15-5-30	19-5-30	4 «
T	14-5-30	16-5-30	2 «
V	7-5-30	11-5-30	4 «
U	15-5-30	19-5 30	4 «
Ao	18-6-30	21-6-30	3 «
Ae	19-7-30	20-7-30	1 »
Aj	25-7-30	28-7-30	3 «
Ai	24-3-30	27-7-30	3 «
Ah	26-7-30	28-7-30	2 «
Ao	6-10-30	10-10-30	4 «
Bg	14-10-30	15-10-30	1 «
Bh	14-10-30	17-10-30	3 «
Bj	14-10-30	18-10-30	4 «
Bu	11-10-30	13-10-30	2 «
Bm	19-11-30	22-11-30	3 «
By	19-11-30	21-11-30	2 «
Bq	17-11-30	23-11-30	6 «
Br	15-12-30	18-12-30	3 «

Com effeito, ha formas graves, superagudas, apresentando apezar disto um quadro anatomopathologico identico aos demais.

TERMINAÇÃO—Seguramente não observamos nenhum caso de cura, pois que terminavam todos pela morte. Uma vez por outra, os animaes ficavam arrepiados, tristes, inappetentes e assim permaneciam 2 ou mais dias, recobrando por fim a saúde. Isto acontecia, de ordinario, quando se lhes inoculava virus inactivo ou attenuado, incapaz de infectar. Provados mais tarde, com virus seguramente activo, adoeciam sempre, no tempo regular de incubação. Essa alteração deve correr talvez por conta do choque operatorio, porque era observada tambem nos animaes inoculados com bacterias e que não adoeciam.

SYMPTOMAS—A evolução, comquanto rapida, transcorre por phases susceptiveis de distincção. Podem-se perceber na doença, além do periodo incubatorio, os seguintes periodos:

a) periodo de tristeza
b) periodo adynamico
c) periodo preagonico
d) periodo agonico.

O periodo da tristeza dura, de ordinario, um dia, podendo, porém, prolongar-se por dois ou mais dias. Dois symptomas caracterisam este periodo em que se inicia a doença: tristeza e inappetencia. A ave procura metter a cabeça debaixo da aza e assim permanece indefinidamente, immovel no poleiro. A principio reage aos ruidos produzidos com a nossa presença, abre os olhos e movimenta-se; com o progresso da doença fica indifferente. O olhar vae perdendo o brilho e a expressão, e as palpebras teimam em permanecer fechadas, movendo-se preguiçosamente. As pennas ficam arrepiadas. Nesta phase as evacuações são normaes. A este periodo se succede um estado de crescente adynamia. As azas cahem, os movimentos são tardos e as reacções ao ruido quasi desapparecem. Neste periodo ha um symptoma caracteristico, resultante da adynamia—o animal, com os membros impotentes para sustentar o peso do corpo, fixa o bico na grade da gaiola ou sobre o sólo, quando desce do poleiro. As palpebras raramente se descerram, e assim mesmo quando o animal é provocado pela producção de fortes ruidos. Tocado, elle não solta mais aquelle grito estridente, proprio das aves deste genero; é um grasnar rouquenho e fraco, quasi um gemido. As pennas sujam-se pelo arrastamento nas dejecções. Estas, que são normaes no periodo anterior, tornam-se liquidas, lactecentes, alvadias, não tendo sido notado mau cheiro em qualquer periodo da doença. O exame microscopico revela serem constituidas por uratos amorphos, resultantes, portanto, de urina collectada na cloaca. Este symptoma é prenuncio do aggravamento do mal. Dahi por deante tornam-se cada vez mais frequentes, acompanhando a adynamia. Seu apparecimento occorre, de ordinario, durante o dia e na tarde desse mesmo dia, sobrevem o periodo preagonico.

No periodo preagonico o animal não se levanta mais e, se o faz, é muito imperfeitamente, arrastando-se quasi. O bico não deixa jamais desamparado o corpo, cujas azas cahidas, tornam o animal derreado. Agora difficilmente as solicitações externas provocam reacções oculares ou vocaes. Curioso é que, ainda assim, ajudado pelo bico mantem-se elle, ás vezes, no poleiro.

Só o vemos impotente para mover-se no periodo agonico, que é um aggravamento do periodo que acabámos de descrever. Um dos papagaios observados por nós chegou a morrer com o bico seguro numa das malhas da tela da gaiola, sem della se despegar. Neste periodo não ha mais reac-

ções. Apenas o animal respira fundo, devagar e sem irregularidades no rythmo. Não observando bem, dir-se-ia morto. E' preciso approximar-se sufficientemente ou tocal-o para certificar-se do engano. A diarrhéa branca se torna muito frequente nos dois ultimos periodos e acompanha-se, não raro, de sangue que, misturado ao liquido da diarrhéa cobre o fundo da gaiola de um lençol liquido de côr rosa.

Ao contrario do que era de esperar, o periodo agonico se prolonga muito, por mais tempo do que os da tristeza e o de adynamia. Vimos aves que permaneciam assim dois ou mais dias. A morte quasi sempre se deu sem que nos apercebessemos e quando o vimos, notámos que occorria com movimentos convulsivos pouco activos. Via de regra o animal se extingue no fundo da gaiola, de bruços, escorrendo pelo bico mucosidade incolor ou avermelhada, que suja o logar onde fenece o doente.

A evolução clinica da doença de *virus* no papagaio faz lembrar o quadro das doenças typhicas humanas, que se caracterisam pelo estado de estupôr ou perda do conhecimento prolongado; caberialhe bem a denominação de *typho do papagaio* si não fôra o perigo de uma denominação que tão grandes confusões tem trazido em pathologia.

Transmissão a outros animaes

As tentativas até agora levadas a effeito para conseguir infectar outros animaes ficaram sem resultado. Ellas foram realizadas em *camondongos*. Apezar do resultado negativo que deram tentativas anteriores, e ainda porque Krumwiede, Bedson e outros conseguiram por via cerebral, determinar encephalites nestes animaes com o virus da psittacose, procuramos infectar, por esta via, nas experiencias seguintes:

Camondongo I—Inoculado em 10-10-30 com 0,05 c.c. de emulsão de figado fresco do papagaio Ao, via cerebral. A 16 appareceu com diarrhéa e morreu a 17-10-30. A necropsia revelou sómente a existencia de petechias no peritoneo e o exame histopathologico evidenciou como *causa-mortis* lesões de melioidosis. Muitos camondongos de nossa criação vinham soffrendo de algum tempo alterações na saúde—diarrhéa, perda de pellos, emmagrecimento em consequencia de excesso de alimentação lactea, symptomas conhecidos daquella doença. As fezes do animal inoculado a 10-10-930 foram 4 dias depois, quando appareceu com diarrhéa, emulsionadas em agua physiologica e inoculadas noutro camondongo e no papagaio Bu, ambos por via peritoneal. Nenhum delles adoeceu e o papagaio Bu, provado a 7-11 com virus do papagaio Bg, adoeceu a 11 e morreu a 13-11, com lesões extensas no figado e no baço e alterações histopathologicas typicas da doença do virus. Os orgãos (baço e figado) do camondongo

doente, morto no dia seguinte, foram emulsionados em agua physiologica, logo após a morte, e inoculados i. p. em dois outros camondongos, que não adoeceram. O cerebro foi emulsionado, separadamente, em agua physiologica, inoculado (0,05 c.c.) i. c. em dois outros camondongos que tambem não adoeceram.

II e III—inoculados como o camondongo I, em 10-10-30. Apresentaram, como aquelle, diarrhéa em 18 e morreram ambos em 19-11, sem apresentarem lesões necroscopicas apparentes, mas exhibindo lesões histopathologicas de melioidosis. Fizemos uma emulsão com fragmentos dos cerebros destes dois animaes e o inoculámos i. p. no papagaio Bv. Este animal apresentou-se triste e inappetente 20 dias passados, symptomas que desappareceram em seguida. Passado para regimen de carencia, a servir em provas bacterianas, appareceu triste e morreu 3 dias depois. Não lhe foram encontradas alterações macroscopicas e o exame histopathologico mostrou apenas degeneração parenchymatosa do rim.

IV—inoculado como os outros e na mesma data, nada apresentou de anormal.

Gallinhas—Inoculamos em frango, a 10-10-30. tambem por via cerebral e na dose de 0,1 c.c., a mesma emulsão que servira para inoculação dos ratos. Esta ave não adoeceu. Valendo-nos assim de uma via, que para certos virus é a unica que assegura garantia á infecção, a via cerebral, não conseguimos infecção.

Passaros—Resta alludir ás inoculações feitas em passaros. Em 16-10-30 inoculamos i. p. os seguintes passaros, adquiridos no mercado da cidade [8]:

2 chopins (*Aopus chopi* Vieill.) dose 0,1 c. c.
2 pixoxós (*Haplospiza unicolor* Cab.) dóse 0,05 c. c.
2 gurundys (*Tachiphonus coronatus* Vieill.) dose 0,1 c. c.
2 pintasilgos (*Spinus ictericus* Licht.) dose 0,05 c. c.
2 colleiros papa-capim ou papa-arroz (*Sporophila superciliaris* Cab.) dose 0,05 c. c.
2 canarios da terra (*Sicalis flaveola* Licht.) dose 0,05 c. c.

Um animal de cada uma destas especies foi deixado como testemunha, em gaiola separada. Destes passaros morreram: os dois chopins, os dois pintasilgos e um dos colleiros em 27-10, sem apresentarem alte-

[8] A determinação destas especies e dos psittacideos com que trabalhamos foi feita pelo Dr. Rodolpho von Ihering, a quem agradecemos a gentileza.

rações macroscopicas á necropsia. Um dos canarios morreu a 30-10, tambem sem apparentes alterações cadavericas. O exame histopathologico revelou no figado destes animaes intensa congestão dos vasos sanguineos e independente della, pequenos fócos de proliferação mesenchimatosa. Não foram encontradas as inclusões que nos psittacideos caracterisam a doença.

Nos trabalhos anteriores foi referida a impossibilidade de transmissão da doença a animaes de laboratorio—cobayas, camondongos, macacos e gallinhas.

Havendo Sturdee e Scott observado a penetração do *virus* da psittacose pela pelle raspada de coelho, no qual produz vesiculas analogas ás do *virus* herpetico, inoculámos o nosso *virus* na pelle raspada de coelhos e cobayas, apezar de saber que taes animaes não eram sensiveis ao *virus*. Nenhuma alteração soffreu a pelle ou a saúde dos animaes inoculados.

III—ESTUDOS SOBRE AS BACTERIAS

Nas investigações da epizootia de papagaios observada no parque da Agua Branca encontrámos em quasi todas as aves uma bacteria que assimilámos desde lógo ao genero *Salmonella*, mas que não era a especie descripta por Nocard em 1892. O estudo aprofundado deste germen só muito mais tarde poude ser completado, havendo apresentado grande numero de amostras isoladas daquelles papagaios acção pathogenica e propriedades semelhantes, além de relações de immunidade, constituindo por isso especie á parte.

Depois da epizootia da Agua Branca, estudámos cerca de 100 papagaios inoculados ou mortos expontaneamente e, de certo numero delles isolámos bacterias que, nas placas de isolamento exhibiam o aspecto das colonias de salmonellas. Estas, reunidas: a duas amostras isoladas por Hoffmann & Reineck e offerecidas ao nosso Instituto, pelo prof. W. Loele, de Dresden; a tres amostras enviadas pelo prof. Lewis, de Birminghan, isoladas por elle e por Thomson e a varias amostras isoladas anteriormente, durante a epizootia da Agua Branca, constituiram motivo do estudo que ora é apresentado, grupadas segundo suas relações especificas.

Grupo a)—*Salmonella psittacosis*

As amostras estudadas originaram-se das seguintes fontes:

a) amostra Nocard, cedida em 5-2-30, por gentileza do Dr. Arlindo Assis, recebida por elle em 1922 do Museu Kral, de Vienna, provavelmente oriunda do Instituto Pasteur de Paris e isolada pelo proprio Nocard. Figura na colleção do Instituto Biologico, sob o nº 746.

b) amostra recebida em 9-4-30 do University Public Health Laboratory, de Birminghan, enviada pelo prof. C. J. Lewis, a pedido de S. P.

Thomson, a quem a solicitaramos. Trazia indicações: isolada de fezes de uma gaiola contendo um papagaio. Este e seu possuidor morreram de psittacose, porém o germen não foi encontrado no corpo do dono do papagaio. Tem em nossa collecção o nº 744.

c) amostra recebida em 26-11-30, da N. C. T. C., nº 915 ou 1951 (?), isolada por M. Perry. Não trazia indicações. E' provavel que seja a que Perry isolou em 1920 de um papagaio africano (*Schizorhis concolor*), morto de enterite. Conserva-se em nossa collecção sob o nº 738.

d) duas amostras enviadas expontaneamente pelo Prof. Lewis, a quem ficámos summamente gratos, isoladas por elle de periquito e de papagaio, guardadas em nossa collecção sob o nº 747 a primeira e sob nº 748 a segunda.

e) amostras isoladas por nós em psittacideos mortos no correr das nossas investigações: nº 34, isolada do figado de uma arara morta expontaneamente no parque da Agua Branca, em Julho de 1929, com lesões pulmonares e hepaticas de necrose em fócos; nº 24, proveniente do figado do periquito nº 1, morto em consequencia de choque, após inoculação experimental; amostra Am, do papagaio deste numero inoculado com *virus*.

Estas amostras foram estudadas nas suas propriedades:

1) *Culturaes*—vê-se no quadro VI que todas as amostras apresentam caracteres communs que são: bastonetes moveis, Gram negativos, turvam o caldo, no qual dão deposito pulvurelento e pelle. Acidificam o leite e o alcalinisam dentro de uma semana; reduzem e produzem fluorescencia no vermelho neutro; não dão indol, reduzem os nitratos a nitritos, não produzem acetyl-metyl-carbinol; não fundem a gelatina. Descoram o meio de Jordan-Harmon.

Sobre os assucares informa o quadro VII que são fermentados, com producção de gaz: glycose, levulose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose, maltose, dextrina, mannita, sorbita, dulcita e xylose (algumas amostras fermentam estes assucares sem formação de gaz). Fermentam fracamente, sem producção de gaz, glycerina e inosita. Não são fermentadas: saccharose, lactose, raffinose, inulina, adonita e salicina. O amido é fermentado fracamente, com ou sem gaz, por algumsa amostras.

2) *Agglutinativas*—Agglutinam bem em sôro agglutinante para *Salm. psittacosis* e *S. aertrycke*, aquelle preparado com a amostra 746. Algumas dellas agglutinam tambem com sôros agglutinantes das salmonellas *suipestifer* e *schottmülleri*. Estes sôros foram preparados com amostras já indicadas em trabalho anterior, quasi todas provenientes da N. C. T. C.

As amostras de Lewis e a do papagaio Am só agglutinam com sôro *psittacosis* (v. quadro VIII).

QUADRO VI

Propriedades culturaes das amostras de Salmonellas psittacosis

NOME	Mobilidade	Gram	Caldo	Leite tornasolado	Vermelho neutro	Meio de Jordan-Harmon	Prova de Voges Proskauer	Producção de indol	Reducção dos nitratos	Acção sobre a gelatina
746 (Nocard)	MM	—	TDCP	AK	rf:	K	—	—	...	nf
744	MM	—	TC	AK	Rf-	K	—	—	—	nf
738	MM	—	TD	AK	Rf-	K	—	—	—	nf
748	M	—	TDC	AK	Rf-	K	—	—	—	nf
747	M	—	TDP	AK	Rf-	K	—	—	—	nf
Pg A. M.	M	—	TCD	AK	Rf-	Kn	—	—	—	nf
Pg Bs	M	—	TCDP	AK	Rf-	k	—	—	—	nf
Pg 34	MM	—	TDP	AK	Rf-	K	—	—	—	nf
Pg 24	M	-	TDP	A	Rf-	K	—	—	—	nf

NOTAÇÕES — M movel, TDCP turvação, deposito, collar pellicula, A acido, K alcali, N neutro, F funde, NF não funde. As letras minusculas indicam acção fraca.

Estas notações são applicaveis a todos os quadros.

QUADRO VII

Fermentação dos assucares pelas amostras de Salmonella

Amostra	Glycose	Levulose	Galactose	Mannose	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	
746	A	AG	AG	AG	AG	AtG	AG	0	AG	0	0	A
744	AG	AG	AG	A	AG	A	AG	0	AG	0	0	A
738	AG	AG	AG	AG	A	A	A	0	AG	0	0	A
747	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	0	AG	0	0	
S.	AG	AG	AG	A	A	A	AG	0	at	0	0	
[1] 748 R.	AG	AG	AG	AG	AG	AG	A	0	At	0	0	
Pg Am	AG	AG	A	A	A	A	AG	0	A	0	0	
Pg Bs	AG	AG	AG	AG	A	AG	A	0	AG	0	0	
Pg 34	AG	AG	At	AG	AG	AG	0	0	AG	0	0	
Pg 24	A	AG	AtG	A	A	AtG	0	0	AG	0	0	

NOTAÇÕES — A acido, G gaz, t tardio. As letras minusculas indicam fermentação fraca

Estas notações se applicam a todos os quadros.

[1] — S colonia lisa, R colonia rugosa.

psittacosis.

	Inulina	Amido	Mannita	Glycerina	Sorbita	Dulcita	Inosita	Salicina
G	0	atG	A	a	AG	AG	A	0
G	0	at	AG	a	AG	A	A	0
G	0	atG	AG	a	AG	AG	a	0
0	0	0	AG	0	AG	At	a	0
0	0	0	AG	0	AG	AG	AG	0
0	0	0	AG	0	AG	AG	0	0
0	0	0	A	0	AG	AG	0	0
0	0	aG	AG	0	AG	a	0	0
AG	0	A	AG	At	AG	AG	At	0
AG	0	at	AG	At	AG	A	A	0

QUADRO VIII

Propriedades agglutinativas das amostras de Salm. psittacosis.

NOME	S. aertricke Tit. — 25.000	S. suipestifer Tit. — 25.000	S. paratyphi Tit. 20.000	S. schottmulleri Tit. — 10.000	S. abortus-equi Tit. — 5.000	S. gallinarum Tit. — 640	S. pullorum Tit. — 2.560	S. pullorum Tit. — 2.500	S. anatum Tit. — 1.280	S. columbensis Tit. — 640	S. psittacossis Tit. — 2.500	S. nocardi (pg 21) Tit.—5.000	S. psittac. 4 Tit. 1.200	S. Sektion II Tit. 5.000	S. Fl — Tit. 1.200
746 (Nocardi)	10.000	640	0	0	1.200	0	0	0	320	0	2.500	0	0	0	0
744 (Thomson)	5.000	5.000	0	20.000	320	0	0	0	320	0	1.280	0	0	0	0
738 (Perry)	5.000	5.000	0	10.000	320	0	0	0	0	0	2.500	0	0	0	0
Lewis (pap.)	0	0	0	0	320	0	0	0	320	0	5.000	0	0	0	0
Lewis (pqt.)	0	0	0	0	320	0	0	0	0	0	5.000	0	0	0	0
Pg Am	10.000	0	0	0	1	0	0	0	160	0	2.500	0	0	0	0
Pg Bs	2.500	640	0	0	160	0	0	0	160	0	1.280	0	0	0	0
Pg 34	10.000	5.000	0	20.000	320	0	0	0	160	0	1.280	0	0	0	0
Pg 24	2.500	2.000	0	0	160	0	0	0	0	0	1.280	0	0	0	0

NOTA — A diluição inicial do soro fora 1 : 20 mas para facilitar a leitura só annotamos nos quadros as agglutinações de 1/160 para cima.

Nenhuma dellas apresentou affinidades sôrologicas com as *Salm. paratyphi, anatum* e outras salmonellas de aves (*pullorum, gallinarum* e *columbensis*), nem com sôros preparados com amostras isoladas da epizootia da Agua Branca.

Pela prova da saturação das agglutininas (quadro IX), poude verificar que as relações agglutinantes com a *S. suipestifer* corriam por conta de agglutininas de grupo, porque nenhuma dellas foi capaz de saturar quantidade sufficiente de anticorpos agglutinantes deste sôro para ser tomada como positiva. O sôro *aertrycke* foi saturado totalmente pela amostra Nocard e parcial ou totalmente pelas outras amostras.

Todas as amostras saturaram completamente o sôro *S. prittacosis*.

Grupo b) — *Bacterias da Agua Branca e outras que não foram identificadas á Salm. psittacosis.*

Escolhemos das amostras isoladas na Agua Branca, anteriormente estudadas, as amostras Pg: 2, 4, 8, 9, 21, 25, 109 e 113, e mais as amostras isoladas posteriormente: Pg 80, isolada do papagaio B, morto da doença do virus expontanea; Pg 110, isolada do papagaio N, morto da doença do virus experimental; Pg 115, isolada das fezes do papagaio L, *ex-vivo* e não inoculado; Pg 116, do sangue do coração do papagaio P; Pg 117, isolada das fezes do papagaio K, *ex-vivo,* não inoculado; Pg Sm, isolada das fezes do papagaio trazido pelo Prof. Sergio Meira e Pg Aff, morto por doenças do *virus,* experimental. Estas amostras foram estudadas, como as anteriores nas suas propriedades:

QUADRO IX

Apsorpção de agglutininas de soro antisalmonellas pelas amostras de Salmonella psittacosis

Amostras usadas para absorpção	Sôros agglutinantes — Titulo após absorpção		
	aertrycke Titulo 25.000	*suipestifer* Titulo 25.000	*psittacosis* Titulo 5.000
Pg 23	6.400	12.800	0
Pg 24	800	12.800	200
Pg 32	800	6.400	0
Pg 34	1.600	6.400	0
738	6.400	6.400	0
744	1.600	6.400	0
746	0	6.400	0
S. aertrycke	0	—	—
S. suipestifer	—	0	—
S. paratyphi	—	—	—
S. ab. — aqui	—	—	—
Pg 21 [1]	25.000	25.000	5.000

[1] — *Salmonella nocardi,* funccionando como testemunha.

1) *Culturaes*—vistas no quadro X. No estudo das propriedades estudadas pudemos destacar, pela pesquiza da mobilidade, um grupo de 8 amostras (as 8 primeiras collocadas no quadro), que se mostraram immoveis.

Nas outras propriedades este grupo se confunde quasi inteiramente com as outras amostras e com os caracteres das bacterias do genero *Salmonella*. Os caracteres culturaes, pois, das amostras deste grupo, foram: bacillos *immoveis*, Gram negativos, turvam o caldo com formação de deposito e collar. Acidificam o leite nas primeiras 24 horas, neutralisam com 48 horas e no 3º dia começam a alcalinisal-o, franca e progressivamente. Reduzem com amarellecimento e fluorescencia o vermelho neutro, descoram o meio de Jordan-Harmom.

Não dão acetyl-metyl-carbinol, produzem indol, reduzem nitratos a nitritos. Não liquefazem a gelatina. O ensaio da acção fermentativa sobre os assucares deu o resultado seguinte: fermentação positiva com producção de acido e gaz da glycose, levulose, galactose, mannose, maltose, dextrina e mannita; fermentação demorada, com producção de acido sem gaz, do amido e glycerina; fermentação lenta com producção de acido, ás vezes com gaz, da arabinose e sorbita. Não são fermentadas: xylose, rhamnose, saccharose, lactose, raffinose, innulina, adonita, dulcita, inosita e salicina (v. quadro XI).

Os caracteres fermentativos permittiram pois separar dentre as amostras deste grupo, oito que se distinguiam das outras amostras isoladas de papagaio da mesma fonte ou de fontes differentes.

2) *Sôrologicas*—Postas em contacto com sôros preparados com diversas salmonellas e com sôros de amostras isoladas de papagaios, verificamos que o grupo immovel agglutinava bem como o sôro das amostras Pg 2 e 21 deste grupo, e não agglutinava com o sôro da amostra Pg 25, nem com sôros das outras salmonellas. Por outro lado, as amostras do grupo movel e varias especies de salmonellas de nossa collecção não agglutinavam no sôro das amostras immoveis, (Pg 2 e Pg 21) nem tampouco no sôro da amostra movel (Pg 25) e nos sôros das outras salmonellas (v. quadro XII).

Houve algumas coagglutinações no sôro anato, a titulo baixo, que pelas provas de saturação de agglutininas, vistas no quadro XIII, revelaram não serem especificas. Actuando sobre o sôro Pg 2, do grupo immovel, a saturação, pelo contrario, foi completa. Trata-se evidentemente de um grupo de germens bem caracterisado, que póde ser destacado como especie autonoma e que não se approxima da *Salm. psittacosis*. As demais amostras não apresentaram com elle quaesquer relações de parentesco, nem mesmo umas com as outras.

QUADRO X

Propriedades culturaes das amostras Pg NÃO *identificadas a Salmonella psittacosis*

NOME		Mobilidade	Gram	Caldo	Leite tornasolado	Vermelho neutro	Jordan-Harmon	Voges-Proskauer	Producção de indol	Reducção dos nitratos	Gelatina
Pg	*2*	I	—	TDC	AK	RFN	D	—	+	+	nf
Pg	*21*	I	—	TD	AK	RFN	D	—	+	+	nf
Pg	*109*	I	—	TDC	AK	RF	D	—	+	+	nf
Pg	*110*	I	—	TP	AK	RF	D	—	+	+	nf
Pg	*113*	I	—	TD	AK	RF	D	—	+	+	nf
Pg	*115*	I	—	TC	AK	RFN	D	—	+	+	nf
Pg	*116*	I	—	TC	AK	RFN	D	—	+	+	nf
Pg	*117*	I	—	TC	AK	RFN	D	—	+	+	nf
Pg	4	MM	—	TDP	A	RFN	DD	—	+	+	nf
Pg	8	MM	—	TDP	A	RFN	DD	—	+	+	nf
Pg	9	MM	—	TDC	AC	RF	DD	+	+	+	nf
Pg	25	MM	—	TD	A	RFN	DD	—	+	+	nf
Pg	80	M	—	TDC	AC	RFN	N	—	+	+	nf
Pg	S.M.	MM	—	TDC	AK	RF	N	—	—	+	nf
Pg	Aff	MM	—	TCD	AK	N	dN	—	+	+	nf

NOTA — As oito amostras primeiras são *S. nocardi.*

QUADRO XI

Fermentação dos assucares das amostras Pg não identi

Amostra		Glycose	Levulose	Galactose	Mannose	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Lactose
Pg	*2*	AG	A	AG	A	At	0	0	0	A	0
Pg	*21*	A	AG	AG	AG	AtGt	0	0	0	AG	0
Pg	*109*	AG	AG	A	AG	At	0	0	0	AG	0
Pg	*110*	A	AG	AG	A	At	0	0	0	AG	0
Pg	*113*	AG	AG	At	A	At	0	0	0	AG	0
Pg	*115*	AG	AG	At	A	At	0	0	0	AG	0
Pg	*116*	A	AG	AtG	A	AtG	0	0	0	AG	0
Pg	*117*	A	AG	AG	AG	AG	0	0	0	AG	0
Pg	4	AG	AG	AG	AG	AG	AG	0	0	AG	at
Pg	8	AG	AG	AG	A	AG	AtG	0	0	AG	at
Pg	9	AG	AG	AG	AG	AG	at	AG	A	AG	At
Pg	25	A	AG	A	AG	At	At	AG	0	AG	At
Pg	80	AG	AG	AtG	AG	AG	0	A	0	AG	At
Pg S. M.		AG	A	AG	AG	A	A	0	AG	a	0
Pg Aff		A	A	0	A	0	0	0	0	0	0

NOTA — as 8 primeiras são *S. nocardi.*

Ticadas a Salmonella psittacosis.

Raffinose	Dextrina	Inulina	Amido	Mannita	Glycerina	Sorbita	Dulcita	Inosita	Salicina
0	AG	0	at	AG	At	AtGt	0	0	0
0	AG	0	0	AG	At	AtGt	0	0	0
0	AG	0	at	AG	At	AtGt	0	0	0
0	AG	0	at	AG	At	AtGt	0	0	0
0	AG	0	0	AG	a	At	at	0	0
0	AG	0	0	AG	At	AtGt	0	0	0
0	A	0	at	AG	at	At	0	0	0
0	AG	0	at	AG	At	A	0	0	at
0	AG	0	a	AG	0	0	AtGt	0	0
0	AG	0	a	AG	0	AG	0	0	at
AG	AG	0	a	AG	0	AG	0	0	AG
0	AG	0	0	AG	a	At	0	0	AG
0	AG	0	at	AG	a	AG	AG	0	0
AG	0	0	0	AG	AG	0	0	0	AG
0	0	0	0	A	0	0	0	0	A

QUADRO XII

Agglutinação das amostras Pg. NÃO *identificadas á Salm. psittacosis.*

AMOSTRA	Sôro aertrycke Tit. — 12.500	Sôro S. suipestifer Tit. — 12.500	Sôro S. paratyphi Tit. — 20.000	Sôro S. aschottmulleri Tit. — 20.000	Sôro S. abortus-equi Tit. — 5.000	Sôro S. gallinarum Tit. — 640	Sôro S. pollorum Tit. — 2.500	Sôro S. pollorum Tit. — 2.500	Sôro S. anatum Tit. — 10.000	Sôro S. columbensis Tit. — 640	Sôro S. psittacosis Tit. — 5.000	Soro S. nocardi (Pg 21) Tit. — 5.000	Soro S. nocardi (Pg 2) Tit. — 10.000	Sôro *s. sp.* (Pg 25) Tit. — 10.000	Sôro *s. sp.* (Psit. 4) Tit. — 1.200	Sôro *s. sp.* (Sektion II) Tit. — 5.000	Sôro Fl. Tit. — 1.200
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1.280	0	0	5.000	10.000	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.000	10.000	0	0	0	0
109	0	0	0	0	0	0	0	0	240	0	0	5.000	2.500	0	0	0	0
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.000	5.000	0	0	0	0
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.000	5.000	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.000	10.000	0	0	0	0
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.500	5.000	0	0	0	0
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.000	5.000	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	640	0	0	160	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1.280	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	10.000	0	0	0
80	0	0	0	320	0	0	0	0	0	0	0	160	0	0	0	0	0
Pg S. M.	0	0	0	0	0	0	0	0	160	0	0	0	0	0	0	0	0
Pg Aff	0	0	0	0	0	0	0	0	160	0	0	0	0	0	0	0	0

QUADRO XIII

Absorpção de agglutininas.

Amostra absorvente	Sôro Pg 2 Tit. — 1 : 10.000		Amostra absorvente	Sôro anato Tit. — 1 : 10.000	
	Antes de absorvido	Depois de absorvido		Antes da absorpção	Depois da absorpção
Pg 117	5.000	0			
Pg 121	10.000	0	Pg 9	1.280	640
Pg 116	5.000	0	Pg 8	640	320
Pg 109	2.500	0	Pg 109	640	40
Pg 110	5.000	0			

c) *Doença experimental*

a) *Tentativas com amostras de salmonellas isoladas da Agua Branca.*

As amostras isoladas, quer da epizootia da Agua Branca, quer dos animaes adquiridos pela experimentação, foram provadas na sua acção pathogenica sobre papagaios. O germen a provar era cultivado em agar simples e, após um dia de incubação a 37°, retirava-se uma alça de cultura, que era emulsionada em 10 c.c. de agua physiologica e com esta emulsão praticavam-se as inoculações. Não conseguimos, como se deduz do quadro XIV, obter infecção em nenhum dos papagaios experimentados com amostras que não possuiam relações sôrologicas, atraz referidas; os animaes, quando muito, apparentavam tristeza e relativa inappetencia, no dia seguinte á inoculação, recuperando a saude no 2° ou 3° dia, sem outra consequencia para seu estado geral. Alguns animaes inoculados morreram de choque ou sem doença apparente, ao menos com lesões ou symptomas que pudessem ser visiveis.

As amostras isoladas da Agua Branca, que constituiram um grupo a parte, por nós denominado *Salmonella nocardi,* tambem foram experimentadas na sua acção sobre papagaios, havendo conseguido em algumas aves, resultado positivo.

O exame do quadro XV, que resume estas experiencias, revela que, afora tres inoculações, em que os animaes morreram sem lesões apreciaveis, possivelmente de choque, obtivemos com as amostras 115, 2 e 109, lesões não mortaes, mas com quadro clinico e lesões histopathologicas da doença que atacou os papagaios da Agua Branca.

QUADRO XIV

Inoculaçõer experimentaes com amostras d'Agua Branca, não pertencentes á Salmonella nocardi.

Amostra	Animal	Dose	Via	Resultado +	Resultado ±	Resultado —	Tempo de observação	Observações
	Pqt. AzE	0,1	i. m.			—	25 dias	
	« C E	0,1	i. p.			—	« «	
Pg 112	« V D	0,5	p. o.			—	« «	
	« VrE	0,1	i. p.			—	« «	
	« VrD	0,5	p. o.			—	« «	
Pg 23	« AzD	0,5	p. o.			—	30 «	
	« VDE	0,1	i. p.			—	« »	
Pg 26	« VrE	0,1	i. p.			—	« «	
	« VrD	0,5	p. o.			—	« «	Morreu sem doença apparente, 3 dias após a inoculação. A necropsia revelou apenas congestão geral do intestino. Das fezes, figado e sangue do coração não isolamos salmonellas.
Pg 118	« CzD	0,1	i. p.			—	« «	
	« AmDE	0,5	p. o.			—	» «	Morreu sem doença e sem lesões apparentes, 15 dias após a inoculação.
Pg 9	« AmD	0,5	p. o.			—	20 «	
	« AbE	0,1	i. m.			—	» «	
Pg 25	« AzD	0,5	p. o.			—	« «	
	« VDE	0,1	i. m.			—	« «	
Pg 29	« V E	0,5	p. o.	+		—		Morreu 1 dia após a inoculação. O exame histologico revelou apenas lesões congestivas (choque).
	» V E 2	0,1	i. m.			—		
	Pap. AN	0,2	i. m.	+		—		Morreu 1 dia após inoculação. O exame histologico não revelou alterações (choque).
Pg 25	« AG	0,2	i. p.			—	10 «	Morreu 1 dia após inoculação. O exame histologico revelou apenas congestão generalizada dos orgãos (choque). Inoculado com virus, 10 dias depois da bacteria, foram verificadas no exame histologico somente lesões da doença de virus.

NOTAÇÕES: + doença franca, ± doença passageira, — não adoeceu; i. m. intramuscular, i. p. intraperitoneal, p. o. per os.

QUADRO XV

Inoculações de psittacideos com Salmonella nocardi.

Amostra	Animal	Dose cc.	Via	Resultado +	Resultado ±	Resultado −	Tempo de observação	Observações
Pg 21	Pqt. AmD	0,1	i.p.			—	1 mez	
	« AbE	0,5	p.o.			—	« «	
	» VrDE	0,1	i.p.			—	15 «	
Pg 116	« AzDE	0,5	i.p.			—	« «	
	Pap. Br	0,2	i.p.			±	40 «	Este animal teve apenas tristeza nos 3 primeiros dias após a inoculação. Inoculado 2 mezes mais tarde, com virus, foram encontradas lesões das duas doenças: (necroses em fócos no figado e no baço, necroses incipientes na parede do duodeno), de bacteria e (inclusões acidophilas intranucleares em cellulas do figado, do baço e do duodeno), de virus.
Pg 4	Pqt. V D1	0,5	i.p.			—	40 «	
	« V D2	0,1	i.m.		±?			Morreu 3 dias após, sem lesões necroscopicas e histologicas apreciaveis.
	Pap. Ba	0,2	i.m.					Não adoeceu.
Pg 21	« Bb	0,2	i.p.					Morreu 1 mez depois. Não foi necropsiado.
	« Bc	0,1	p.o.					Morreu 23 dias após, sem doença apparente e apresentou nos vasos lesões congestivas e proliferações de cellulas lymphoides do baço.
Pg 115	« Cy	0,1	i.p.		+			Morreu 9 dias, havendo-se encontrado no figado fócos de necrose (cercadas de forte reacção cellular) e proliferação de cellulas mesenchimatosas e no pulmão fócos de necrose, lesões caracteristicas da doença bacteriana.

Pg	2	«	Cw	0,1	i.p.		±	Teve no dia seguinte diarrhéa frequente e permaneceu assim durante 6 dias quando começou a melhorar. Inoculado mais tarde com virus [2] apresentou lesões histologicas combinadas das duas doenças. como no papagaio Br.
Pg	109	»	Bo	0,1	i.p.		±	Adoeceu como o precedente e foi inoculado, como elle, com virus, tendo-se verificado a existencia de lesões histologicas combinadas das duas doenças, como no papagaio Br.

[2] Para economizar animaes quasi sempre usavamos os papagaios que não morriam logo, quando inoculados com bacteria ou virus, com o outro destes agentes experimentados.

NOTAÇÕES — + doença franca, ± doença passageira, — não adoeceu; i. m. intramnscular, i. m. intraperitoneal, p. o. per os.

Deante da difficuldade de conseguir sempre infecção e para julgar seguramente si as bacterias isoladas de papagaios eram ou não pathogenicas para estes animaes, procuramos reduzir de algum modo a resistencia dos animaes. Lançámos mão, em primeiro lugar, da tinta da China pulverisada, emulsionada em agua distillada esterilisada, evitando assim o uso de estabilisadores. Tomamos dois papagaios, Ag e An 1, nos quaes injectamos no peritoneo, cada tres ou cinco dias, doses crescentes da emulsão, partindo de 1 c.c. e subindo até 4 c.c., dóse esta repetida tres vezes seguidas. As aves estiveram sob a acção do agente bloqueante durante cerca de um mez, quando lhes injectamos 0,1 de alça de amostra Pg 8 numa, e noutra Pg 21, seguida de nova dóse de tinta da China no dia da inoculação e nos dias subsequentes. Os animaes apparentaram tristeza, dois ou tres dias depois da inoculação bacteriana e nada mais.

Não acertando por este caminho lembramo-nos de que a alimentação basica destas aves no Parque da Industria Animal era milho cosido em agua até seu amollecimento. Alimentamos os papagaios Cp, Cq e Cr com uma dieta semelhante, sem outro alimento addicional, de 28-X até 13-XI-30, quando foram inoculados:

I) Papagaio Cp—Inoculado com amostra Pg 21 (0,2 c.c. i. p. e 0,5 p. o.). Appareceu triste a 21, com diarrhéa de fezes amarelladas e mucosas. Morreu tres dias depois (24-XI-30). A autopsia revelou a presença de fócos de necrose sobre o figado, cujo lobo esquerdo se achava recoberto de fibrina. O sacco aereo abdominal continha abundante liquido purulento e fibrina. No pulmão esquerdo havia um fóco de congestão hepatisado. Baço augmentado. Congestão da serosa peritoneal. Amollecimento da parede abdominal á esquerda.

O exame histologico [9] mostrou a presença de nodulos inflammatorios no pulmão, areas de necrose formadas por uma substancia rosea, cercada por cellulas de nucleo vesiculoso ou de protoplasma basophilo. Seios venosos do figado, cheios de hematias e exsudato fibrinoso sobre a superficie do orgão. Como conclusão, o exame histologico verificou a existencia de congestão e fócos inflammatorios no pulmão, necrose em fócos e proliferações mesenchimatosas no figado e proliferação de cellulas reticulares no baço. A bacteria foi recuperada do sangue do coração e das fezes.

2) Papagaio Cq—Inoculado com amostra Pg 29 (0,2 c.c. i. p. e 0,5 c.c. p. o.). Morte no dia seguinte, sem lesões apparentes ao exame microscopico. Notou-se no exame histologico congestão generalisada nos or-

[9] Todos os exames histopathologicos deste trabalho foram feitos pelo Dr. J. R. Meyer, anatomopathologista do Instituto, que fez estudos com este material.

gãos e presença de agglomerados bacterianos no baço, lesões de choque por consequencia. A bacteria foi encontrada no sangue do coração e nas fezes, em cultura pura [10].

3) Papagaio Cr—Este papagaio não foi inoculado, e já estava um tanto triste quando inoculamos os outros dois. Assim continuou até 28-XI-30, quando morreu. Não apresentava alterações apparentes ao exame cadaverico e o exame histologico verificou hemorrhagias nas vias aereas inferiores e degeneração perenchimatosa do figado. Deste orgão, e sómente delle, cultivamos uma bacteria que não agglutinou nos sôros que possuiamos para identificação de bacterias deste genero.

O uso do milho cosido parecia, pois, facilitar a acção pathogenica da amostra Pg 21, que anteriormente não fora capaz de infectar, quando a inoculamos, uma unica vez, como vimos no quadro XV. Outra experiencia foi feita com esta orientação: Papagaios By e Bz foram alimentados exclusivamente com milho cozido durante 15 dias, após o que foram inoculados com uma mistura das amostras Pg 21, 26 e 29, tomada uma alça de cultura de cada uma e emulsionada num só tubo contendo 10 c.c. de agua physiologica; inoculamos 0,2 c.c. da emulsão, i. p. e 1 c.c. p. o.

O papagaio By adoeceu cinco dias depois. Havendo melhorado, foi inoculado com virus um mez mais tarde. O exame histologico revelou nelle lesões da doença do virus ao mesmo tempo que lesões da doença da Agua Branca. A cultura do liquido peritoneal e das fezes foi pura de uma bacteria que não agglutinou em sôro agglutinante para uma das bacterias inoculadas (Pg 21).

O papagaio Bz adoeceu no dia seguinte e morreu passados 4 dias. Notou-se á autopsia a presença de manchas escuras nas auriculas e congestão e edema do duodeno. Histologicamente havia necrose em fócos e proliferações mesenchimatosas no figado e proliferação de cellulas reticulares do baço, lesões identicas ás verificadas na Agua Branca. As culturas das fezes, figado e sangue do coração foram puras de salmonellas, dentre as quaes poude ser identificada uma das amostras (Pg 2), para a qual possuiamos sôro agglutinante.

A dieta exclusiva de milho é incapaz de matar o papagaio, mesmo prolongada por um largo tempo, nós o experimentamos; entretanto, parece crear condições favoraveis á infecção. Outra prova da influencia favoravel da alimentação impropria para gerar condições de maior receptividade a bacterias tivemos numa doença, de apparencia epizootica, apparecida

---

[1] A determinação da bacteria inocnlada neste caso foi possivel somente por suas propriedades culturaes, porque não possuiamos soro que a agglutinasse.

posteriormente num viveiro de araras da Agua Branca, cujos detalhes vão referidos adeante. Dos animaes doentes foram isoladas bacterias de varios generos, que não demonstraram acção pathogenica para psittacideos. Aquelles animaes tinham, como alimentação basica, milho cosido.

Bastou mudar o regimem alimentar para que desapparecesse a doença e se restabelecessem os animaes, cessando as mortes.

Não tentaremos ainda repetir as inoculações, á semelhança do que provavelmente se dera na infecção natural, isto é, pela reinoculação do agente infectante. Decidimos experimental-o num lote de seis papagaios, designados sob os numeros Cj, Ck, Cl, Cm, Cn e Co.

De bacterias cultivadas em agar, 1 alça emulsionada em agua é dada cada dia pela bocca, nas duas primeiras dóses; nas dóses seguintes, para evitar trabalho de emulsionar, deram-se 2 c.c. de cultura em caldo. As dóses eram repetidas e propinadas todos os dias, durante 9 dias seguidos, sendo então suspensa a administração. As inoculações iniciaram-se a 5 e terminaram a 13-XI-30. Deste modo foram inoculados:

1) Papagaio Cj, com amostra Pg 21. Adoeceu francamente no 3º dia de inoculação e morreu 5 dias após a ultima dóse de bacterias.

O exame cadaverico revelou grandes zonas de congestão em ambos os pulmões, com nodulos de puz; exsudato na cavidade abdominal, figado ligeiramente amarello, baço crescido e congestão da via alimentar.

O esfregaço do pus pulmonar e do figado revelou a existencia de numerosas fórmas bacterianas em bastonetes, Gram-negativas, e a cultura deste material deixou vegetar unicamente colonias de uma bacteria que poude ser identificada pelo sôro agglutinante da propria bacteria utilisada para a inoculação. O exame histologico demonstrou a existencia de proliferações mesenchimatosas e tromboses capillares no figado, proliferações de cellulas reticulares do baço e grande fóco de necrose pulmonar.

2) Papagaio Ck, inoculado com a amostra Pg 8. Appareceu triste no 4º dia de inoculação, mas já melhorara antes de terminadas as inoculações. Nada mais teve.

3) Papagaio Cl, inoculado com a amostra Pg 29. Adoeceu ao mesmo tempo que o papagaio Ck e morreu em 17-XI-30. O exame cadaverico mostrou sómente o figado amollecido e de côr escura, quasi negra, e o baço augmentado de volume. Histologicamente encontraram-se necroses em fócos no figado e proliferação dos elementos reticulares do baço.

4) Papagaio Cm, inoculado com Pg 9. Appareceu triste no 3º dia de inoculação, assim permanecendo alguns dias, havendo mesmo melhorado, até que 24 dias depois de ter começado as inoculações e 16 dias da ultima dóse, começou a apresentar diarrhéa mucosa e grande tristeza.

No dia seguinte estava quasi agonico, mas melhorou um pouco no outro dia, embora continuasse encolhido no poleiro; foi melhorando, porém, aos poucos, alimentando-se regularmente e movimentando-se na gaiola.

Com o decorrer dos dias, notamos um emmagrecimento progressivo, sem outro signal qualquer da doença. Amanheceu morto em 7-1-31, ou sejam 54 dias após a ultima dóse inoculada de bacterias. Ao exame histologico notaram-se fócos de necrose no pulmão e algumas proliferações mesenchimatosas no figado, lesões identicas áquellas encontradas em papagaios da Agua Branca.

5) Papagaio Cn, inoculado com amostra Pg 36. Appareceu triste ao mesmo tempo que outros papagaios deste grupo; foi sacrificado 5 dias após a ultima dóse da bacteria. Exames necroscopicos e histologicos não revelaram alterações em seus orgãos.

6) Papagaio Co, inoculado com amostra Pg 26. Permaneceu triste durante todo o tempo das inoculações mas retomou o aspecto normal alguns dias após a suspensão de sua administração. Mais tarde foi inoculado com *virus*. O exame histologico demonstrou a existencia no figado de necrose em fócos, proliferação discreta de elementos mesenchimatosos e raras inclusões acidophilas; no baço necrose em fócos, proliferação das cellulas reticulares e raras inclusões; lesões mixtas, pois, de doença bacteriana e doença de *virus*.

Outro caminho tambem procurado para facilitar a infecção foi o da descamação da mucosa intestinal mediante a administração previa de bile pela bocca, realisada pela manhã, em jejum. A um lote de 5 papagaios são propinados 2 c.c. de bile e 2 horas depois dá-se-lhes a beber 0,2 c.c. de alça de cultura em agar, semeada na vespera. São inoculadas, em cada um, as amostras Pg 9, 80 e 8. respectivamente.

Os animaes são deixados ainda 2 ou 3 horas sem se alimentarem. Nenhum adoeceu.

b) *Tentativas com amostras de Salmonella psittacosis.*

Foram experimentadas nas inoculações as amostras 746 (de Nocard), 744 (de Thomson) e Pg 32 e 34, isoladas por nós. A amostra de Nocard foi inoculada em periquitos, pelas vias muscular, peritoneal e oral, empregando-se culturas de 24 horas. Dos 6 animaes inoculados neste lote, apenas um adoeceu e morreu, 14 dias depois de inoculado.

Os exames necroscopico e histopathologico revelaram no seu cadaver alterações analogas ás da doença da Agua Branca.

QUADRO XVI

Inoculações de psittacideos com Salmouella psittacosis.

Amostra	Animal	Dose cc.	Via	Resultado +	Resultado ±	Resultado −	Tempo de observação	Observações
746 (Nocard)	Pqt. C D	0,1	i. m.			—	1 mez	
	« C E	0,1	i. m.			—	1 mez	
	« AmD	0,1	i. p.	+				Morte 14 dias. Figado — necrose em fócos, baço — pallido. Exame histologico Congestão dos vasos pulmonares; figado — necroses (raras) em fóco, com centro fibrinoso e intensa proliferação de cellulas mesenchimatosas em redor dos vasos; proliferação das cellulas lymphoides do baço.
	« AmE	0,1	i. p.			—	1 mez	
	« O	0,5	p. o.			—	1 mez	
Pg 32	Pap. B I	0,1	i. p.			—		Morreu no dia seguinte apresentando congestões generalizadas (choque).
	Ppt. V D	0,1	i. m.			—		
	« AzD	0,1	i. m.			—		
	« V E	0,1	i. p.			—		
	« AzE	0,1	i. p.			—		
	« VrD	0,5	p. o.			—		
	« O	0,5	p. o.			—		
	Pqt. AzE	0,1	i. p.	+				Morte 7 dias apresentando nodulos necroticos no figado, de cor amarello-avermelhada. O exame histologico revelou a existencia de hemorrhagias intestinaes e necroses em fóco, com centro fibrinoso no figado. A bacteria foi recuperada dos orgãos [1].
	« VdE	0,1	i. p.	+				Morte 7 dias apresentando figado com nodulos necroticos, baço grande e pallido e congestão visceraes. O exame histologico. . . A bacteria foi recuperada dos orgãos.
Pg 34	« AzD	0,1	i. m.	+				Morreu no dia seguinte com lesões congestivas generalizadas (choque). Bacteria recuperada dos orgãos.

	Pqt. V D	0,1	i. m.	+			Morreu no mesmo praso e com as mesmas alterações do precedente.
	« VrD	0,5	p. o.	+			Morte 8 dias. Necrose em fócos no figado. Exame histologico. Necroses em fócos com centro fibrinoso no figado e congestão com trombos bacterianos nos pulmões. Bacteria recuperada dos orgãos.
	« O	0,5	p. o.	+			Morte 9 dias. Figado — necrose em fócos; baço — crescido e pallido; intestino — congestão. Essas alterações foram confirmadas histologicamente. Bacteria recuperada dos orgãos.
	« AbD	0,5	p. o.	+			Morte 8 dias. Figado vermelho com raras manchas claras, baço ligeiramente augmentado, conteudo intestinal escuro. Exame histologico — necroses em fócos e proliferações mesenchimatosas no figado.
745	« O	0,1	i. m.	+			Morte no dia seguinte com lesões congestivas generalizadas (choque).

[1] — Semeaduras do figado, sangue do coração e fezes.

NOTAÇÕES — + doença franca, ± doença passageira, − não adoeseu; i. m. intramuscular; i. p. intraperitoneal p. o. per os.

A amostra 744 foi inoculada em periquitos, matando um de choque e causando no outro doença que o matou ao cabo de uma semana.

Das nossas amostras, a Pg 32, inoculada em 6 periquitos, pelas tres vias, muscular, peritoneal e oral, não foi capaz de infectar nenhuma das aves. A Pg 34, pelo contrario, produziu doença em todos os seis animaes em que foi inoculada, sem excepção de um só e as lesões anatomopathologicas verificadas condiziam com as lesões dos papagaios da Agua Branca.

Passagem da doença bacteriana em serie.

A' maneira do que foi tentado com a doença de virus, procuramos verificar tambem si a doença bacteriana passava em serie. Inoculamos figado do papagaio Bz, doente e morto em consequencia da inoculação de uma mistura de amostras 21, 26, e 29, nos papagaios Ci e Ca. Este adoeceu no 3º dia e morreu após a inoculação. Encontramos no cadaver pus, exsudato fibrinoso, que fazia adherir a superficie anterior do estomago á parede abdominal, além da congestão do intestino. A cultura das fezes permittiu recuperar uma das bacterias isoladas, porque só para esta (Pg 21), possuiamos sôro agglutinante. O papagaio Ci não adoeceu.

No peritoneo da maitaca Cj 1, inoculamos figado do papagaio Cj, morto pela amostra Pg 21, administrada repetidamente durante dias seguidos.

A maitaca adoeceu e morreu 2 dias após e encontramos o figado recoberto de fibrina, peritonite purulenta, congestão do intestino, particularmente da 3a. alça. Fragmentos do figado desta ave foram emulsionados e inoculados no peritoneo da maitaca Cjj, que morreu dez dias depois com lesões semelhantes á primeira. O exame histologico encontrou neste animal congestão e necrose em fócos no figado, proliferações reticulares no baço e congestão e degeneração parenchymatosa do rim, lesões caracteristicas da doença bacteriana.

Puz pertioneal do papagaio Cp, morto em consequencia de inoculação da amostra Pg 21, foi emulsionado e inoculado nos papagaios Bs e Bt.

Bs morre 15 dias depois, com pericardite e peritonite fibrinopurulenta, saccos aereos cheios de pontilhado amarello e massas caseosas, figado escuro, muito congesto, baço grande, com hemorrhagias capsulares, rins augmentados de volume e intestinos congestionados. Exame histopathologico: intenso processo inflammatorio nos saccos aereos thoracicos, proliferações reticulares no baço, pericardite purulenta e tromboses hyalinas nos capillares dos glomerulos do rim. A bacteria foi recuperada das fezes e do pus peritoneal, em cultura pura.

Bt não adoeceu; injectado, 42 dias mais tarde, com amostra de Nocard, morreu durante a noite, apresentando á necropsia lesões de choque e não revelando o exame histologico lesões de importancia, além da congestão generalisada que caracterisa esta *causa-mortis*.

Novos casos de doença bacteriana expontanea.

Uma vez verificado que os papagaios albergavam com frequencia salmonellas, adquirimos na ilha de S. Sebastião, litoral paulista, um lote de 5 papagaios da especie *Amazona farinosa*. Estas aves estavam um pouco tristes e apresentaram logo que chegaram diarrhéa de fezes mucosas, verdes.

Na cultura das fezes cresceram e foram isoladas salmonellas. A diarrhéa cessou em poucos dias e retornaram quasi todas as aves aspecto normal. Um dos animaes do lote, papagaio L, não melhorou e morreu pouco depois, sem lesões macroscopicas ou histologicas ao exame necroscopico.

Estava com o intestino prenhe de helminthos. De suas fezes foi isolada a amostra de salmonella Pg 114, que, tendo sido perdida, não poude ser identificada.

Dos outros papagaios, K, I, M e O, que tiveram diarrhéa e sararam, foram, depois de sarados (K e O após um mez e M após dois dias), inoculados com virus. Todos morreram em consequencia desta infecção e os exames histopathologicos revelaram nelles lesões das duas doenças, bacteriana e de *virus*. Das fezes do papagaio K isolamos a amostra 117, identificada á *Salmonella nocardi* e do seu figado isolamos uma bacteria que coagulava o leite e não poude ser identificada. As amostras isoladas das fezes e sangue do coração de M foram eliminadas, porque fermentavam a lactose e coagulavam rapidamente o leite. Do papagaio O só estudamos uma amostra, isolada das fezes, *ex-vivo*, que não poude ser identificada; nas culturas das visceras não cresceram salmonellas. O papagaio N foi inoculado com virus antes de sarar completamente e de seus orgãos não foram isoladas salmonellas. Uma das amostras isoladas de suas fezes, *ex-vivo*, foi identificada á *Salmonella nocardi* e figura neste trabalho sob o nome Pg 110.

ACÇÃO PATHOGENICA SOBRE OUTROS ANIMAES

Um lote de 20 *cobayas* foi inoculado com as amostras Pg: 27, 107, 29, 95, 2, 116, 113, 26, 25 e 24, duas para cada animal, uma por via subcutanea, na dóse de 0,1 c.c. de cultura em caldo, e outra por via oral com 1 c.c. Alguns desses animaes morreram em prasos variaveis de uma se-

mana a um mez, sem apresentarem alterações cadavericas ou histologicas de importancia.

Um lote de 8 *pintos* foi inoculado com as amostras Pg: 116, 117, 24, 29 e 26. Quatro outros *pintos* receberam duas amostras de *S. psittacosis* e 2 outros *S. anatum*. Dos pintos inoculados com amostras Pg morreram todos, excepto os inoculados com Pg 26. O exame histologico entretanto só revelou nelles a existencia de alterações congestivas. Dos inoculados com *Salm. anatum*, morreram ambos, com alterações identicas aos inoculados com amostras Pg. A amostra Nocard matou um dos inoculados e o exame histologico encontrou necroses em fócos no figado e proliferação mesenchimatosa do figado e do rim e proliferações reticulares do baço.

Outro lote de 12 *pintos* foi inoculado, 6 com amostras Pg 8 e 9; e 6 com *S. anatum* e bacillo de Nocard. Dos animaes inoculados com amostras Pg morreram dois, inoculados i. p. com Pg 8, notando-se sómente lesões congestivas pelo exame histologico, não se havendo recuperado a bacteria das culturas feitas com os orgãos. A *S. anatum* matou um pinto inoculado i. p. tendo-se obtido o mesmo resultado precedente com os exames histologico e cultural. O bacillo de Nocard matou os pintos que o receberam i. p., havendo-se recuperado a bacteria das culturas dos orgãos. Ao exame histologico encontraram-se lesões necroticas no figado, além de hemorrhagia nos rins e pulmões.

Symptomas e evoluções da doença bacteriana experimental

A inoculação bacteriana nem sempre era seguida de infecção, mas, quando bem succedida, a doença exhibia symptomas analogos, qualquer que fosse experimentada. Os representantes da *Salmonella psittacosis* causaram a morte em tempo mais regular do que as amostras *S. nocardi*. Não houve differenças, porém no tempo de incubação, que nas duas especies variou de 2 a 8 dias; mais vezes os animaes adoeciam no 3º dia.

A evolução da doença pela *S. psittacosis* foi de uma semana, como vimos; a da *S. nocardi* prolongou-se mais, havendo durado até 10 dias, nos casos em que adoptamos as dóses repetidas de culturas para infectar. E' frequente a existencia de infecções não terminadas pela morte, mormente quando causadas pela *Salm. nocardi*.

Symptomas: —A inoculação nem sempre tem como consequencia a infecção, sendo commum o apparecimento de uma indisposição, 1 a 2 dias após a inoculação, seguida da recuperação lenta da saúde. Quando injectado, o animal entristece, encolhe-se no poleiro, cabeça sob a aza ou dobrada sobre o pescoço; treme, alimenta-se pouco, tem sêde e diarrhéa passageira, de fezes mucosas. Este symptoma não apparece sempre, e é

mais frequente nos casos graves. Quando a infecção vinga, observam-se os mesmos symptomas acima, accrescidos de queda de azas, conspurcamento de pennas e sêde mais apreciavel. Nunca se observa a adynamia e e a inappetencia absoluta do virus.

Uma alteração somatica por vezes observada é um extremo emmagrecimento. A cachexia sobrevem nos casos de evolução longa. Esta fórma evolue sem symptomas funccionaes ou com symptomas analogos aos casos frustros acima referidos. Quando muito permanecem menos vivazes.

O que salta á vista são as alterações somaticas, que vão apparecendo pouco a pouco, concedendo ao animal um aspecto especial: as pennas vão perdendo a vitalidade, fragmentando-se nas extremidades, deixando apparecer a parte cinzenta das plumas proximas. Esta alteração, alliada a um descoramento da plumagem restante, torna a côr do animal verde cinza, parecendo sujo. Com o progredir do emmagrecimento accentuam-se essas alterações trophicas: o bico perde o aspecto continuo, parece esfoliar-se e a cabeça e o pescoço vão-se desplumando. O aspecto do animal é curioso, quasi grotesco. A doença parece prolongar-se por muito tempo. Um dos papagaios, deixado evoluir assim permaneceu até 27-VI-31 quando, por necessidade de serviço foi sacrificado, havendo-se encontrado lesões de doença bacteriana no figado.

Em resumo, podemos distinguir 4 fórmas de infecção causada por Salmonellas:

1)—*fórma frustra*—observada com salmonellas *psittacosis* e *nocardi*, não mortal, caracterisada por alterações passageiras seguidas de cura em poucos dias.

2)—*fórma aguda, grave*—causada pelo germen de Nocard, acarretando com frequencia a morte apos uma semana de doença.

3)—*fórma subaguda*—com evolução variavel de uma semana ou mais, de fraca lethalidade e caracter menos grave.

4)—*fórma chronica* ou *cachetisante*—de longa evolução.

As duas ultimas fórmas são mais observadas na infecção pela *Salm. nocardi* mas podem ser causadas por outras bacterias do mesmo genero, sem caracter especifico.

Outras doenças

Afóra os casos de infecção natural e experimental, estudados em detalhe até agora, outras doenças occorrem nos papagaios, de etiologia obscura e de symptomatologia variavel. Com effeito, no correr de nossos estudos, observamos uma vez por outra, morte expontanea de papagaios,

não procedida de symptomas particulares, a não ser tristeza e innappetencie. Os exames cadaverico e histopathologico em taes casos revela algumas vezes alterações que serão examinadas a seguir ou não adeantavam sobre a *causa-mortis*. Desde as nossas primeiras investigações, ainda na vigencia da epizootia da Agua Branca, observamos morte de prittacideos sem doença apparente.

O caso se deu do seguinte modo: um lote de 6 periquitos (*Psittacula passerina*) e duas maitacas (*Aratinga cactorum*), todos de saúde apparente, foi vaccinado com amostras isoladas de papagaios da Agua Branca (cultura em caldo de 24 horas, seguramente morta pelo calor).

Estas aves seriam depois collocadas no viveiro que continha os papagaios doentes, afim de se verificar a acção etiologica das bacterias então isoladas, pela prova da immunidade. Os animaes appareceram tristes no dia seguinte e no 3º dia morreu uma das maitacas. O exame cadaverico revelou nella a existencia de numerosos fócos de necrose no figado e congestão das alças intestinaes, e na pesquiza histopathologica, verificaram-se necroses em fócos no figado, congestão nos pulmões e no baço, e lesões de esplenite aguda com grande hyperplasia das cellulas reticulares.

Culturas do figado e das fezes produziram cultura pura de colonias de uma bacteria que mais tarde foi identificada ao germen de Nocard.

No dia em que morreu a maitaca, a sua companheira e um dos periquitos continuavam tristes. A segunda maitaca morreu á tarde deste mesmo dia com discreta congestão intestinal. O exame histopathologico revelou unicamente existencia de forte congestão dos vasos sanguineos pulmonares. Culturas das fezes, deram vegetação de colonias de bacterias do genero *Escherichia* (coli) tendo sido esterеis as culturas do figado e sangue do coração.

O periquito triste morreu no dia seguinte com o intestino congestionado. Encontraram-se alterações sem importancia pelo exame anatomopathologico (degeneração parenchimatosa do figado e do rim).

Nas culturas feitas com sangue de coração, figado, baço e fezes não cresceram bacterias.

Quatro dias depois morre outro periquito, com lesões hemorrhagicas (petechias), sobre a superficie externa do estomago glandular ou proventriculo. O exame histologico encontra no figado proliferações histiocytarias e capillares sanguineos prenhes de bacterias que não tomavam Gram. A cultura do sangue do coração, fezes e figado deu colonias de bacterias dos generos *Escherichia* (coli), *Aerobacter* (aerogenes) e colonias transparentes, cujas amostras não puderam ser identificadas.

Vimos morrer outros psittacideos depois destes, sem lesões histopathologicas que indicassem doença: papagaios ns. 30, 31, Aa, Ab e A1.

O exame histologico foi levado a effeito nos tres ultimos, havendo-se encontrado alterações sómente no derradeiro, em cujo figado havia diversos adenomas. Emulsão deste orgão foi inoculado, *per os,* em papagaio que não adoeceu e que foi, dois mezes mais tarde inoculado com virus que o matou em 8 dias com lesões typicas de doença desta natureza. As culturas dos orgãos do papagaio A1 foram negativas para salmonellas e não existiam adenomas.

Nos meiados de Maio de 1930 trouxe-nos o Prof. Sergio Meira um papagaio apresentando tristeza, tosse e quasi aphonico. Este animal veiu a morrer na noite de 28 para 29 deste mez e encontrou-se á necropsia uma extensa necrose no lobo esquerdo do figado, pequenos pontos brancos esparsos na massa do orgão e uma ulcera no intestino delgado com reacção inflammatoria. Ao exame histologico encontraram-se congestão dos vasos pulmonares, um fóco necrotico no figado, cercado de uma zona de reacção inflammatoria, com feixes de fibrocytos e algumas cellulas gigantes, formando syncicio. A cultura das fezes desta ave deu vegetação de colonias de uma salmonella que não agglutinou em sôros agglutinantes especificos para *Salmonella psittacosis* e *S. nocardi,* (figura nos quadros o nome Pg Sm).

Material deste papagaio, (emulsão de orgãos), foi inoculado numa maitaca que nada apresentou de anormal, durante um mez de observação. Em outubro de 1930 recebemos um lote de papagaios da Bahia, dos quaes morreram dois expontaneamente e sem apparentar doença, além de relativa tristeza. Nelles não se encontraram lesões necroscopicas. Orgãos de um delles foram examinados histologicamente e encontraram-se no figado lesões de doença bacteriana, isto é, proliferação de pequenas cellulas redondas de nucleo vesiculoso e protoplasma praticamente invisivel, proliferação discreta dos elementos mesenchimatosos e congestão moderada do baço, rico de cellulas de aspecto lymphoide. As culturas praticadas com figado e sangue do coração deste animal resultaram negativas, mas das fezes isolamos, dentre colonias de bacterias das fezes, colonias de uma bacteria que agglutinava em titulo elevado em sôro de *Salmonella psittacosis* e não agglutinava em sôros da *S. nocardi.* Parece que se tratava no caso de paragglutinação porque, provada alguns mezes mais tarde, essa propriedade já estava reduzida a titulo muito baixo (1:640), insufficiente para que fosse tomada como especifica. Não obstante o laudo histopathologico deixava a possibilidade de tratar-se de uma doença bacteriana antiga.

Nesse mesmo mez trouxe-nos o Dr. Floriano de Almeida um papagaio que adoecera expontaneamente com tristeza, innapetencia e enterite sanguinolenta. O animal estava somnolento, de azas cahidas, olhos semi-

cerrados mas movia-se bem e não tinha tremores sempre estava arrepiado. Eliminava de vez em quando fezes fortemente impregnadas de sangue. Morreu na noite do dia em que o recebemos. O exame cadaverico permittiu verificar a existencia de muco no intestino, figado com algumas manchas amarellas, semelhantes a depositos de fibrina e baço de consistencia molle. O exame histologico encontrou no figado unicamente lesões de doença bacteriana.

Fezes deste animal, colhidas *ex-vivo,* foram inoculadas pela bocca no papagaio Bm, sem resultado. Este papagaio foi inoculado com virus um mez depois, morrendo no tempo regular, havendo-se encontrado nos exames anatomo-pathologicos sómente alterações da doença de virus.

Nada conseguimos pela inoculação de figado e fezes emulsionadas em agua physiologica, i. p. e p. o., na maitaca Bu.

Nas culturas do figado e fezes cresceram colonias de uma bacteria, de que estudamos 3 amostras, juntamente com duas outras, isoladas por Hoffmann & Reineck, referida anteriormente.

Finalmente o Dr. Santos Abreu trou-xe-nos dois papagaios, ambos tristes e com diarrhéa sanguinolenta, dos quaes morreu um, no dia seguinte, e outro recobrou a saúde, embora apresentasse crises de tristeza e não falasse mais dahi por deante. Nas verificações anatomo-pathologicas foi visto que o figado do papagaio morto estava um pouco duro e apresentava uma mancha clara no bordo inferior do lobo direito. As verificações histologicas revelaram proliferações mesenchimatosas no pulmão, degeneração parenchymatosa do figado e proliferação de cellulas reticulares do baço, isto é, lesões de natureza bacteriana. As culturas do figado e das fezes deram vegetação de colonias que simulavam salmonellas mas que provas bacteriologicas demonstraram pertencer provavelmente ao genero *Escherichia* (coli), pois que coagulavam o leite e fermentavam a lactose, com producção de gaz, em 24 horas.

Durante o tempo que duraram nossos estudos observamos algumas vezes doenças em papagaios não inoculados, não terminadas pela morte. Em quasi todos limitavam-se os symptomas a tristeza e inappetencia, permanente ou transitoria, seguidos de restabelecimentos vagaroso da saúde do animal. Não sendo seguidas de morte nem se transmittindo a outros animaes torna-se difficil saber sua natureza e etiologia.

Estudos das amostras isoladas de papagaios mortos por bacterias não assimiladas ás duas especies Salm. psittacosis e S. nocardi

Consideramos aqui unicamente as amostras isoladas dos papagaios:

a)—offerecido pelo Dr. Floriano de Almeida.

b)—do papagaio do grande lote importado da Bahia e morto expontaneamente.

c)—amostras Sektion e Pap. IV isoladas por Hoffmann & Reineck, seja porque foram isoladas em cultura pura de papagaios com symptomas e lesões de doença bacteriana, seja porque provieram de papagaios mortos sem doença apparente mas com lesões histologicas de doença bacteriana, seja porque foram verificadas pathogenicas para homem e psittacideos (amostras de Hoffmann & Reineck).

O estudo das propriedades culturaes não revelou qualidades communs entre ellas: as amostras obtidas do papagaio enviado pelo Dr. Floriano dee Almeida (designados por Fl 1, Fl 2 e Fl 3), isoladas do figado e das fezes, possuem caracteres interessantes: bastonetes longos, filamentosos, immoveis, Gram negativos, dispostos isoladamente ou em cadeias; fundem a gelatina dentro da primeira semana de cultura, em fórma cylindrica, da superficie ao fundo; acidificam fracamente o leite nas primeiras 24 horas para coagulal-o em seguida, peptonisando lentamente o cogumêlo; não alteram o vermelho neutro e não dão indol; não reduzem os nitratos.

QUADRO XVII

Propriedades culturaes de amostras pathogenicas (?) para papagaios, não assimiladas ás duas especies S. psittacosis e nocardi.

Amostra	Mobilidade	Caldo	Leite tornasolado	Jordam Harmon	Vermelho neutro	Indol	Acethil methyl Carbinol	Nitrificação	Gelatina
Pg Fl 1	I	TCD	ACP	D	0	—	—	—	F
Pg Fl 2	I	TCD	ACP	D	0	—	—	—	F
Pg Fl 3	I	TCD	ACP	D	0	—	—	—	F
Pg Bahia	M	TCD	ACP	dN	0	—	+	—	F
Sektion II	M	TCD	A	D	rf	+	+	—	O
Psit. IV	M	TCD	Ac	dn	rf	+	+	—	O

Sobre os assucares mostraram-se fracos fermentadores, com affinidade especial para monosaccharideos, porém sem producção de gaz.

Assim, fermentam a glycose, galactose, mannose e arabinose; fermentam lentamente a rhamnose e duas dellas fermentam lentamente a lactose.

Foram incapazes de fermentar a levulose, saccharose, maltose, raffinose, dextrina, inulina, amido, adonita, mannita, glycerina, sorbita, dulcita, inosita e salicina.

Esta bacteria constituirá motivo de trabalho á parte.

A amostra Pg Bahia é um bastonete movel, Gram negativo, coagula o leite tardiamente (depois do 20º dia) e o peptonisa, não altera o vermelho neutro e funde a gelatina no mesmo tempo e com o mesmo aspecto das amostras Fl, mas na fermentação dos assucares approxima-se mais das outras amostras do quadro, recebidas de Hoffmann & Reineck. Estas differem uma da outra porque a que fôra isolada de papagaio com psittacose coagula o leite, propriedade não observada na amostra de psittacose humana, que o mantém acido permanentemente, reduz fracamente o Jordan-Harmon para neutralisal-o rapidamente, emquanto a outra alcalinisa rapida e definitivamente o meio. Ambas reduzem fraca e lentamente o vermelho neutro e não produzem indol e acetyl-methyl-carbinol. Differiam ainda uma da outra na sua acção fermentativa sobre a inosita e a raffinose, que a amostra de papagaio fermenta com producção de gaz, propriedade de que não gosa a sua companheira.

O estudo sôrologico desse grupo de amostras não revelou aspectos interessantes. Nenhuma dellas mostrou relações de parentesco pela agglutinação, a não ser as duas amostras de Hoffmann & Reineck que se agglutinavam reciprocamente e saturavam os respectivos sôros.

DOENÇA EM ARARAS

Quando já se achavam terminados os estudos acima referidos, appareceram doentes algumas araras de um viveiro dessas aves, do Parque da Industria Animal. Os animaes vinham entristecendo de alguns dias antes de nossa visita. Os mais doentes estavam innapetentes, tremulos e arrepiados. Dejecções normaes. Morreram logo duas das araras. Uma dellas foi registrada sob o nº 1. Necropsiada, logo depois, foram-lhe encontradas extensas alterações, limitadas exclusivamente ao intestino. Consistiam em manchas amarellas, salientes, arredondadas, medindo 2 a 3 mm. de diametro e raras areas de aspecto hemorrhagico. Correspondiam a ulcerações interessando a mucosa e a submucosa intestinaes. As glandulas, na porção superficial e nas partes adjacentes, estavam desapparecidas e no seu logar existia um exsudato fibrinoso com abundancia de pequenos mononucleares.

QUADRO X

Fermentação de amostras pathogenicas (?) para papagaios, n

Amostra	Glycose	Levulose	Galactose	Mannose	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Lactose
Pg. Fl 1	A	0	A	A	A	A	At	0	0	0
Pg. Fl 2	A	0	A	A	A	A	At	0	0	At
Pg. Fl 3	A	0	A	A	A	0	At	0	0	At
Pg. Bahia	AG	AG	AG	AG	A	A	AtG	AG	A	0
Sektion II	A	AG	AG	A	A	0	0	AK	A	0
Psit. IV	A	AG	AG	A	A	0	0	AG	A	0

VIII

ão assimiladas as duas especies psittacosis e nocardi.

Raffinose	Dextrina	Inulina	Amido	Adonita	Mannita	Glycerina	Sorbita	Dulcita	Inosita	Salicina
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AG	0	0	0	0	AG	A	AtG	0	0	A
0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	A
AG	0	0	0	0	A	0	0	0	AGK	AG

A porção da musculatura correspondente ás ulceras achava-se edemaciada e prenhe, tambem, de pequenos mononucleares. A serosa estava normal. No figado notava-se, além da inchação turva, fócos de proliferação mesenchimatosa, constituidos quasi exclusivamente por pequenos mononucleares.

A sua companheira, arara nº 2, teve diagnostico anatomo-pathologico identico, accrescido de congestão intestinal.

Poucos dias depois morreu mais uma, nº 3 e, com mais dois dias a nº 4.

Ambas apresentavam as mesmas manchas encontradas nas primeiras, relacionadas a inflammações ulcerativas do intestino.

Exames microscopicos dos orgãos dessas aves não trouxeram esclarecimento algum na sua etiologia microbiana. Egualmente não adoeceram papagaios inoculados com emulsão de orgãos, i. p., ou fezes, p. o., dos cadaveres examinados.

Culturas feitas com orgãos ou sangue do coração só deram vegetação de bacterias do genero *Escherichia*, que se mostraram inocuas para papagaio, quer inoculadas i. p. ou p. o.

O conhecimento dos factos anteriores, observados nos papagaios, levou-nos a aconselhar o abandono do milho cosido, que constituia a base de sua alimentação, para milho inchado, deixado vegetar parcialmente pela immersão em agua, além de sementes e outros alimentos que se lhe ajuntou, isto é, medidas tendentes a supprimir a monotonia alimentar. Os resultados não se fizeram esperar: não morreram mais aves e as doentes recuperaram a saúde pouco a pouco. Actualmente, 5 mezes depois, estão em optimas condições.

Um facto interessante nos chamou a attenção sem encontrarmos para elle explicação. Achavam-se recolhidas ao viveiro 21 aves. Destas, 6 pertenciam á especie *Anotorrhynchus hyacinthinus*; 9 á especie *Ara ararauna*; 6 á especie *Ara chloroptera*. Desta sómente as aves pertencentes á especie *Ara ararauna* adoeceram. Será porque são mais resistentes ou têm maior reserva de vitaminas ? Não sabemos.

DISCUSSÃO

A pathologia veterinaria até agora não fez distincção dentre as doenças que causam syndromes descriptos como *psittacose* nos papagaios.

Em 1893 Nocard isola de medulla ossea humeral de uma carcassa de papagaio conservada, uma bacteria pathogenica para este animal. A aza pertencera a um papagaio que morrera durante a viagem da Argentina para Paris, em consequencia de mortifera epizootia surgida entre pa-

pagaios de um lote de 500 aves adquiridas naquelle paiz por negociantes francezes. A bacteria reproduzia em papagaios doença semelhante a que fôra observada entre os animaes do lote importado, o qual disseminou a psittacose entre habitantes de dois quarteirões de Paris, onde foram localisados e vendidos aquelles papagaios.

Ficou por essa occasião, mais ou menos acceito o germen descripto por Nocard como o agente etiologico da doença. Com o evolver do tempo reappareceu a doença no homem, endemica ou epidemicamente, sem que entretanto pudesse ser confirmado o achado de Nocard.

De facto, sómente Gilbert e Fournier encontram no sangue do coração de um cadaver, morto em consequencia de pneumonia infecciosa, uma bacteria que elles approximam do germen de Nocard, embora sem provas convincentes. A descripção de Gilbert e Fournier é insufficiente para a assimilação expendida por elles e a inoculação em papagaios, por elles referida, não é valorosa, porque os animaes inoculados morriam em 10 a 12 horas, provavelmente em consequencia de choque, tal qual nos aconteceu successivas vezes. Menos claro ainda é o achado de Palamidese, cuja bacteria não deve ser muito differente da encontrada por Gilbert e Fournier.

Um pouco mais interessante é o trabalho de Sicard, que da medulla ossea e do sangue de um papagaio, responsavel por cinco casos de psittacose numa familia, isolou uma bacteria que não era influenciada pelo sôro de coelho immunisado pelo bacillo de Nocard. Do que sabemos hoje com relação á agglutinação do bacillo de Nocard com a *Salm. schottmülleri* (B. paratypho B), não repugna pensar que se tratava naquelle caso da salmonella descripta por Schottmüller; talvez uma simples infecção primaria ou secundaria por esta bacteria.

A inexistencia do bacillo de Nocard em casos diagnosticados de psittacose humana e relacionados a papagaios, fez com que outros pesquizadores attribuissem a outras bacterias a causa da doença: Haedke em 1898 isola dos dentes varios germens, dentre elles, um de fórma bacillar que fundia a gelatina e que foi tambem encontrado em um papagaio doente que morreu pouco depois. E' provavel que se tratasse de um germen do genero *Proteus*. Selter pretendeu que fossem estreptococcos os agentes causadores da doença no homem e nos psittacideos causadores das infecções humanas.

Recentemente Thomson isola tambem de abcesso parotidiano de um doente diagnosticado de psittacose, o germen de Nocard.

Afóra estes, jamais conseguiram outros pesquizadores encontrar o bacillo de Nocard nos doentes em que foi procurado. Egualmente a pesquiza de agglutininas para este germen no sôro dos doentes foi raramente positiva, tendo-as encontrado sómente Thomson em alguns doentes que estudou na ultima epidemia, na Inglaterra.

Sturdee e Scott regeitam a possibilidade do bacillo de Nocard como causa da psittacose, argumentando que a *Salmonella aertrycke,* que consideram synonymo de *S. psittacosis,* é causa frequente de infecção de animaes porém poucas vezes tem sido registrada no homem. A psittacose do papagaio, pelo contrario, transmitte-se ao homem facilmente. A opinião de Sturdee e Scott é exposada pela maioria dos pesquizadores da psittacose da ultima epidemia.

Por outro lado Western, Bedson e Simpson descobrem no homem um *virus* não visivel, que reproduz a doença em psittacideos, descoberta confirmada logo depois por Krumwiede, Pesch, Levinthal e outros pesquizadores. Ao germen de Nocard caberia o papel de germen de sahida que, em condições especialissimas, infectaria tambem o homem.

Ficaria assim muito reduzida a importancia da descoberta de Nocard si Hoffmann e Reineck não encontrassem nos casos da Saxonia, occorridos em 1930, uma salmonella que existia nas pessoas doentes, nos cadaveres destas e em papagaios doentes e á qual attribuiram, baseados em verificações bactereiologicas, o papel de agente etiologico. Esta verificação fez reviver a possibilidade de bacterias dos papagaios contaminarem tambem o homem. Depois delles Eigler attribue a psittacose a uma bacteria do genero *Hemophylus* por elle isolada de escarros de doentes e do bico de papagaios atacados de psittacose.

Uma relação estreita e directa entre a doença dos papagaios e a humana só foi, porém, conseguida com o virus ultimamente descoberto.

E' do maior interesse o perfeito conhecimento da pathologia das aves para o completo conhecimento da doença humana e sua prophylaxia

Em publicações anteriores já mencionámos a verificação da existencia de varias doenças infecto-contagiosas entre papagaios, passiveis de serem confundidas num exame superficial dos animaes doentes.

Podemos distinguir dessas doenças dois grupos principaes: doenças de *virus* e doenças de bacterias.

Ao primeiro grupo se filiam até agora, a doença descoberta por nós, em collaboração com Otto Bier e a doença cujo virus isolaram Western, Bedson e Simpson, isto é, o germen da psittacose propriamente. Porque não ha duvida que se tratam de doenças differentes: o nosso virus apresenta uma affinidade especifica para psittacideos, especialmente para os do genero *Amazona,* propriedade que não possue o virus descoberto na Europa e na America do Norte, cuja infecciosidade para o homem foi tamanha, que obstou ou fez paralysar em Washington, pesquizas que vinham sendo com elle realisadas e contaminou pessôas de laboratorio no Instituto Pasteur [11], bem como o tratador dos papagaios doentes, no Hospital S. Bartholomeu de Londres, conforme narram Sturdee e Scott, e um medico que trabalhou com Rivers no Instituto Rockfeller. O nosso virus age em diluições muito elevadas, como o virus da psittacose com que trabalharam Western e Bedson; não se poderia attribuir, pois, a exclusiva infecciosidade do nosso *virus* para psittacideos a um enfraquecimento do verdadeiro virus da psittacose que é perfeitamente activo para animaes de laboratorio em pequenissimas doses. O *virus* da psittacose occasiona nos papagaios, alterações particulares, differentes daquellas que se encontram nos animaes mortos pelo nosso *virus*, segundo verificações de Western, Bedson, Gordon, Rivers e outros. O nosso virus produz, nos psittacideos, e sómente nelles, especialmente nas do genero *Amazona,* uma doença não descripta nestes animaes, com caracteres de molde a se poder crear uma doença nova. O virus europeu-americano infecta cobaya, coelho, camondongo, gallinha, canarios, além de psittacideos (Krumwiede, Sturdee, e Scott, Bedson e Western, Gordon e outros).

Completam ainda tão importantes caracteres differenciaes dos dois virus a existencia de inclusões que Meyer encontrou e descreveu em todos os nossos casos de infecção pelos *virus,* inclusões cujos caracteres são differentes daquelles descriptos por Levinthal em infecções naturaes e experimentaes de psittacose e confirmadas por Bedson e Western.

Finalmente o nosso virus não é neurotropico e o virus isolado na America por Krumwiede causa encephalite nos ratos inoculados, o que foi tambem observado por Western, Bedson e Rivers, e paralysias em coelhos e ratos, segundo Gordon. Differe ainda deste, por ser destruido em curto tempo pela desseccação.

---

[11] Communicação verbal do Prof. Debré, em 1930.

DOENÇA DE VIRUS	DOENÇA DE BACTERIA
Incubação — 3 dias, com limites entre 2 e 4 dias.	Variavel de 2 a 8 dias.
Evolução — Rapida. Innapetencia de 2º ou 3º dia seguida de morte em 2 a 3 dias depois.	Variando de 1 semana a 1 mez ou mais, sem innapetencia ou com innapetencia parcial.
Terminação — Morte em 100 o/o dos casos com doença typica. Raramente observam-se formas frustras. A inoculação com virus activo infecta sempre.	A maioria dos casos não morre; têm doença passageira. São necessarios artificios para se conseguir infecção mortal.
Symptomas — Distinguem-se 4 periodos: a) *tristeza* — caracterisado por tristeza, innappetencia, pennas arrepiadas, pouca disposição para locomover-se, olhar inexpressivo, locomoção possivel. b) *adynamico* — azas cahidas, movimentos tardos, indifferença as solicitações. Bico fixado as grades ou ao solo, para não cahir. Defecação frequente de fezes brancacentas liquidas. c) *preagonico* — o animal permanece immobilisado ou se move muito pouco, de longe em longe. O bico está sempre apoiado sobre qualquer coisa. d) *agonico* — não se move mais do logar, permanece de olhos fechados; apenas respira.	Tristeza, pennas arrepiadas, tremores, appetite diminuido mas não supprimido, sêde intensa. Fezes liquidas, verdes ou amarelladas, mucosas ou mucosanguinolentas. O animal esconde a cabeça sob a aza ou dobra o pescoço sobre o corpo. Nunca se apoia com o bico. Os movimentos são faceis até proximo da morte, apezar da pouca disposição ao movimento. As azas cahem e as pennas sujam. Nos casos que vão curar, as melhoras apparecem aos poucos com a maior disposição para se alimentarem.
Forma clinica — aguda e sub-aguda.	1) *Frnsta* — Ocservada com todas as salmonellas. 2) *Aguda* — grave. 3) *Sub-aguda* — durando de 1 a 4 semanas. 4) *Chronica* ou *cachetisante* — de fraca letalidade e de longa duração.

Como o da psittacose, o nosso virus conserva-se em glycerina ou em solução de phosphato, na geladeira; é parcialmente retido pela filtração e resiste a temperatura de 55°.

O nosso virus exhibe caracteres communs aos outros agentes pathogenicos da mesma especie: é sensivel ao calor, ao alcool e aos alcalis, substancias que o inactivam em certas proporções; conserva-se bem sob a glycerina com solução tampão de phosphato, em temperatura baixa; age em grandes diluições; reproduz a doença indefinidamente em serie; atravessa filtros capazes de reter bacterias; produz inclusões nas cellulas parenchimatosas. Differe da maioria delles porque é sensivel ao dessecamento; não parece conferir immunidade, não é absorvido por substancias pulverulentas (kaolin, porcellana pulverrizada) e não separa pela centrifugação.

E' curiosa esta differença de acção entre a glycerina e o dessecamento sobre o *virus*. Agindo a glycerina como deshydratante, sempre que o virus se conserva pelo dessecamento permanece igualmente vivo sob glycerina, exceptuando-se o virus vaccinal que se conserva bem secco e é attenuado em pouco tempo pelo dessecamento. Aqui dar-se-ia o contrario.

Ao grupo das doenças bacterianas se filiam as infecções pela: *Salmonella psittacosis*, *S. nocardi* e outras bacterias.

Justificam a distincção destes dois grupos de doenças de psittacideos, não só a natureza do agente causador (*virus* ou bacteria), mas ainda differenças na symptomatologia, evolução clinica e outras particularidades que caracterisam perfeitamente aquelles dois grupos. Com effeito, a natureza do agente imprime ás infecções caracteres particulares que permittem distinguil-as nos seus aspectos clinico, anatomo-pathologicos e bacteriologicos.

Collocamos no quadro abaixo os caracteres clinicos sufficientes á differenciação.

Diagnostico differencial das infecções observadas em papagaios.

O quadro anatomopathologico offerece caracteres differenciaes importantes: a doença do virus, pelo exame necroscopico, dá ao figado, além de fócos de necrose, identicos aos da doença bacteriana, uma coloração amarella, circumscripta a zonas ou areas de tamanhos variaveis ou generalisada, não altera o intestino e raramente o faz ás serosas.

As bacterias dão ao figado uma tonalidade vermelho-escura, pontilhada de nodulos branco-acinzentados, congestiona o intestino, especialmente a primeira alça e inflamma as serosas, principalmente o peritoneo.

Microscopicamente a doença de virus produz nos orgãos alterações parenchymatosas do typo agudo: necroses em fócos sem reacções cellulares, quer no baço quer no figado. A doença bacteriana occasiona lesões do typo chronico; necroses em fócos no figado, acompanhada de reacções cellulares e proliferações mesenchimatosas e proliferações das cellulas reticulares do baço. Accrescente-se a presença de inclusões acidophilas nucleares, só verificadas na doença de *virus*.

Bacteriologicamente a distincção é simples, uma vez que se inocule em psittacideos o material sufficientemente diluido para permittir a infecção pelo virus, que age em dóses fracas, e sejam observados nos animaes inoculados os caracteres de infecção experimental acima referidos. A cultura do material em placas de isolamento, em meios differenciaes para bacterias pathogenicas do intestino animal, com a verificação dos caracteres basicos da differenciação das duas especies pathogenicas para papagaios mais frequentes, *Salm. psittacosis* e *S. nocardi,* solucionarão o diagnostico.

Estes caracteres podem-se resumir na prova de mobilidade, acção fermentativa sobre lactose, inosita, leite, producção de indol e agglutinação em sôros especificos para as duas especies bacterianas acima mencionadas. A prova da inoculação é facultativa para as bacterias, a vista de inconstancia de seus resultados.

Os caracteres da psittacose dos papagaios, encontrados nos livros classicos, approximam-se mais da doença bacteriana. Ward e Gallagher descrevem-na: os papagaios apresentam tremores, innapetencia, diarrhéa espumosa, esverdeada, por vezes sanguinolentas; têm sêde intensa, somnolencia e pouca disposição para se locomoverem. As azas cahem, os olhos cerram-se, as pennas se arrepiam e a cabeça é voltada para os hombros. Provocados, nota-se grande fraqueza ao movimento. Despresam o poleiro. Apresentam convulsões pouco antes da morte. Na maioria dos casos chronicos ha corrimento de liquido dos olhos e narinas e dyspnéa. Emmagrecem e consequentemente a saliencia esternal e evidencia.

Nocard e Leclainche caracterisam-na do seguinte modo: os animaes se encolhem, eriçam as pennas, deixam cahir as azas, fecham os olhos; ficam inappetentes e permanecem somnolentos até a morte. As fezes amollecem desde inicio; tornam-se depois liquidas, espumosas e algumas vezes estriadas de sangue. Estes autores referem ainda a symptomatologia descripta por Wolf: innappetencia, tristeza, depois diarrhéa de fezes com flocos mucosos; coma; cabeça voltada para os hombros; morte precedida

de convulsões. Algumas vezes notam-se espirros, catarrho nasal, tosse e dyspnéa.

Nocard e Leclainche assignalam, pois, entre symptomas de doença bacteriana, innapetencia e somnolencia prolongadas, até a morte, symptomas peculiares á doença de *virus*. Ward e Gallagher falam tambem de grande fraqueza e do desprezo dos animaes pelo poleiro. Estes autores se referem a corrimento de liquido dos olhos e narinas, que encontramos algumas vezes na doença de virus e segundo elles, nota Wolf a existencia de espirros, catarrho nasal, tosse e dyspnéa, phenomenos só observados por nós no papagaio trazido pelo Prof. Dr. Sergio Meira. A existencia deste catarrho é referida por Sturdee e Scott em papagaios doentes e por Bedson e Western em gallinhas inoculadas com este material.

Os outros symptomas são mais proprios da doença bacteriana, como vimos. A confusão de symptomas permitte, desse modo, pensar na possibilidade da existencia das duas doenças confundidas, dada a pouca attenção que tem merecido dos pesquisadores o estudo da pathologia dos psittacideos em relação á psittacose, como assignalamos de começo.

Mais clara é a descripção que fazem Truche e Bouffanais, duma epizootia occorrida em 1923 entre psittacideos (periquitos e papagaios), do «Jardin des Plantes», de Paris. A doença atacou, de preferencia, periquitos medios e pequenos e poupou araras e cacatôas, talvez, dizem elles, porque estas viviam em liberdade. Os animaes ficavam tristes, somnolentos, pennas arrepiadas, azas cahidas, encolhidos, olhos cerrados. Não tinham appetite mas bebiam frequentemente. Tinham diarrhéa de fezes liquidas, brancacentas e ás vezes com sangue. Evolução rapida, de 24 horas no maximo, e á necropsia encontrava-se congestão intensa dos orgãos abdominaes. Aquelles autores isolaram do sangue dos animaes doentes uma bacteria com os caracteres da *Salm. schottmülleri*.

Exceptuando-se na evolução, a doença descripta por Truche e Bouffanais muito se approxima da que estudámos na Agua Branca e que encontrámos nas infecções bacterianas experimentaes.

Sem entrar em detalhes, assignala Greene a frequencia de febres seticas, transmissiveis por inoculação a pombos, pintos e outras aves domesticas, accrescentando que o agente infectante permanece vivo nas gaiolas até annos, e matando os animaes em 3 a 6 semanas, nunca mais tarde. Outro pesquisador que encontrou alterações cadavericas analogas foi Perry, num papagaio sul-africano cinza (*Schizorris concoulor*), morto de enterite, no qual observou, á necropsia, congestão intestinal e peritonite, havendo isolado do cadaver a *Salm. psittacosis* de Nocard.

Interessante é que esses autores não assignalam a presença das necroses em fócos no figado e no baço, lesão facil de ser verificada e fre-

quente nas duas doenças. O facto fala a favor da infecção bacteriana, pois que não fôra ella tambem verificada macroscopicamente por nós, em muitos dos papagaios doentes da Agua Branca ou infectados artificialmente com bacterias isoladas de papagaios doentes.

Sturdee e Scott referem a observação do Cap. Pitman de que os papagaios africanos cinzas, novos, quando recentemente importados, soffrem frequentemente de enterites com pneumonia, de natureza não especifica, provavelmente, dizem elles, ligadas a condições de temperatura dos climas temperados e frios.

Os pesquisadores da ultima epizootia de psittacose contribuiram pouco para o conhecimento da symptomatologia da psittacose do papagaio, causada por *virus* transmissivel ao homem. Sturdee e Scott a descrevem: os animaes tornam-se menos activos, azas cahidas, plumas arrepiadas e sujas, cerram os olhos e soffrem de diarrhéa, muitas vezes sanguinolenta e corrimento oculo-nasal. A actividade cessa pouco a pouco até o coma. Bedson e Western referem: quéda das azas, olhos semicerrados e innappetencia. A duração da doença experimental é, segundo elles, de 4 a 5 dias e nota-se á autopsia: intestino congestionado, esplenomegalia; serosas normaes. Gordon e Krumwiede deram pouca attenção á symptomatologia da doença experimental nos trabalhos destes autores que pudemos consultar. Elkeles encontra diarrhéa, apathia, somnolencia e tremores nos animaes que transmittiram doenças ao homem.

A frequencia de doenças nos papagaios, não transmissiveis ao homem tão facilmente quanto o é a psittacose, permitte pensar na possibilidade de ser esta doença rara no papagaio. E' um facto similar ao observado com o que acontece com o nosso *virus,* que sómente uma vez encontramos infectando estes animaes, dentre numerosas aves que nos passaram pelas mãos.

A infecção bacteriana dos psittacideos, pelo contrario, deve ser muito mais frequente do que parece. Nós a observámos muitas vezes e as verificações necroscopicas cuidadosas, de par com as inoculações experimentaes, nos mostram a possibilidade frequente de infecções nesses animaes, com evolução silenciosa e seguida de cura expontanea mais vezes que a morte, passando muitas por isso despercebidas. Encontramos muitos exemplos disto nos nossos protocollos para que possamos affirmal-o. A favor da affirmativa falam ainda os achados de cerca de 10 % de lesões histologicas da doença bacteriana nos orgãos de papagaios tidos como normaes, não inoculados, sacrificados por nós, mortos accidentalmente ou mortos em consequencia da inoculação experimental com virus. Devem ser ellas as causadoras das «febres septicas» de que nos fala Greene e responsaveis pelas frequentes mortandades entre esses animaes.

Dentre as bacterias causadoras de infecções nos papagaios prevalecem as salmonellas. Foram essas bacterias que encontrámos sempre nos casos de epizootia da Agua Branca e n'alguns casos de doença expontanea. Exceptuam-se duas infecções de papagaios que foram occasionadas por bacterias peptonizantes e os dois papagaios doentes expontaneamente de *virus,* dos quaes isolámos o nosso *virus*. Só isto bastaria para mostrar que as doenças bacterianas são muito mais frequentes que as determinadas por virus. De resto, a raridade da psittacose humana, assignalada de longe em longe, com largos annos de intervallos entre um caso e outro, tratando-se como se trata de um *virus* facilmente transmissivel ao homem, está mostrando que as doenças de *virus* não são muito communs nos papagaios.

E' ainda a anatomia pathologica que nos ajuda neste pensar, encontrando 10 % de lesões bacterianas em orgãos de papagaios apparentemente normaes ou inoculados experimentalmente com o *virus* unicamente e nunca registando lesões da doença do virus expontanea, a não ser nos dois papagaios dos quaes isolámos o nosso virus.

Está ahi, talvez a chave do engano de Nocard: a psittacose verdadeira (de virus), appareceu entre os papagaios do lote que fôra levado de Buenos Ayres. O papagaio, de cuja aza conservada elle isolou a *S. psittacosis,* estava tambem com doença bacteriana, possibilidade frequente, como vimos. Sendo esta pathogenica para papagaios, nos quaes reproduzia a doença, confundivel com a psittacose dos papagaios, foi tomada a nuvem por Juno. A doença dos papagaios sobreviventes espalhou-se em Paris; Nocard não isolou a sua bacteria dos papagaios sobreviventes e das pessôas doentes contaminadas pelos papagaios e satisfez-se com o achado accidental. Demais, a sua bacteria sendo muito menos frequente que a salmonella que descobrimos nesses animaes, como attestam numerosas pesquisas de laboratorio levadas a effeito durante a ultima epidemia e nós mesmo verificámos, justificam a possibilidade de engano do notavel bacteriologista francez.

Curiosa é a affirmação de Sara E. Branham, na 31ª Reunião Annual da Associação Americana de Pathologistas e Bacteriologistas, em Abril de 1931, referendada em trabalho posterior, de que, de 36 aves normaes, doentes ou artificialmente infectadas com psittacose, isolou mais de 400 colonias sem encontrar uma só pertencente ao genero Salmonella. Nós não observámos essa infrequencia. Mesmo de papagaios normaes, não inoculados, isolámos das fezes amostras de salmonellas pertencentes ou não ás especies que julgámos pathogenicas para estas aves. Foi o que encontrámos em muitos papagaios inoculados ou não, e no lote de papagaios adquiridos na ilha de S. Sebastião. Em alguns desses papagaios foi verificado, após a inoculação de virus, que elles tiveram anteriormente doenças benignas,

reveladas pelos exames histologicos das visceras. Do que observámos podemos affirmar que os papagaios são mais sujeitos ás doenças bacterianas do que á de *virus*. A maior parte dessas doenças é de caracter benigno e causada, ás vezes, pela *S. nocardi*, por nós descripta na epizootia da Agua Branca e encontrada, depois, em papagaios adquiridos no mercado (papagaio P), ou da ilha de S. Sebastião, no littoral paulista (papagaios K, N), que apresentaram diarrhéa mucosa seguida de cura expontanea.

A' bacteria de Nocard e, em determinadas circumstancias á nossa bacteria, seria reservado o papel de productores de epizootias mortiferas.

Como caracter auxiliar na differenciação das duas infecções poderia ser admittida a acção pathogenica para papagaios: A *S. psittacosis* determina em geral infecções agudas e a *S. nocardi* occasiona doenças subagudas ou chronicas. Ambas podem habitar o intestino do papagaio saprophyticamente.

Resta considerar agora o papel pathogenico das outras salmonellas, não passiveis de especificação, encontradas em infecções expontaneas seguidas de morte.

Não ha que duvidar da sua existencia, fundamentada não só na symptomatologia identica á das infecções bacterianas apresentadas por estes casos, senão tambem nas verificações da presença de bacterias nos orgãos dos cadaveres e nas observações histopathologicas de lesões typicas de doença bacteriana nesses mesmos orgãos.

O ensaio da acção pathogenica não deu ensejo a que pudesse ficar demonstrada seguramente capacidade infectante das amostras experimentadas. As tentativas com as amostras Pg 29 (do papg. Cq), Pg 9 (do papg. Cm) e Pg 26 (do papg. Co), revelaram a possibilidade de infecção de psittacideos com outras bacterias que não as duas especies de Salmonellas bem caracterisadas, (*psittacosis* e *nocardi*), dentre as numerosas amostras por nós examinadas bacteriologicamente. De resto, as infecções expontaneas com lesões de caracter bacteriano observadas varias vezes em psittacideos, que não revelaram a presença de virus, com bacterias em cultura pura ou quasi pura dos orgãos e do sangue, reforçam a possibilidade de virem a ser pathogenicas bacterias ordinariamente saprophyticas, em condições mal determinadas. Dentre estas condições, regimen alimentar e hygiene innapropriados, ficaram conhecidas.

As experiencias e as verificações com o uso do milho cosido ou com repetição da bacteria infectante, fazem pensar que avitaminose, intoxicações chronicas e outras affecções podem condicionar, como causas predisponen-

tes, a penetração no organismo de bacterias pathogenicas ou não, vivendo em estado saprophytario no intestino. Cousa semelhante verificou Selter com administração de culturas de streptococcos isolados de doentes humanos ou periquitos accusados de transmittirem a infecção. As aves experimentadas (periquitos), adoeceram 15 dias mais tarde, mostrando-se tristes, diarrheias e com corrimento nasal. Depois de mortos encontraram-se nos orgãos, não os estreptococcos inoculados, porém bacterias com caracteres das salmonellas, agglutinando 1/100 em sôro preparado com amostra isolada de papagaio e coagglutinando a 1/300 com sôro *S. suipestifer*; estas bacterias eram pathogenicas para papagaios, periquitos, camondongos, cobayas e coelhos, isto é, possuiam os caracteres da bacteria de Nocard. Quer dizer, as mesmas condições conhecidas da pathogenia das doenças infectuosas se applicam integralmente ás bacterias em questão.

Attestando nas bacterias isoladas de papagaios e pathogenicas para estes animaes, vemos que se podem distinguir dentre elles duas especies bem caracterisadas: *Salmonella psittacosis* e *S. nocardi*.

A *Salmonella psittacosis* foi isolada e descripta, em 1893, por Nocard, que caracterizou-a: bastonetes moveis, com extremidades arredondadas e Gram-negativos. Turva o caldo e dá pellicula; não funde a gelatina; não fermenta a lactose e não coagula o leite.

Esta descripção foi refeita por Seiffert em 1909, no tocante á fermentação dos assucares, que não foram objecto de estudo por Nocard. Ficou visto que a bacteria fermentava com gaz; arabinose, xylose, glycose, levulose, galactose, mannita e maltose. A quantidade de gaz na glycose e xylose fôra menor que o que produziram as outras salmonellas experimentadas por Seiffert.

Estudaram ainda bacteriologicamente a amostra de Nocard, Ajelo e Parascandalo, sem que do seu extensivo estudo resultasse progresso para o conhecimento da biologia da bacteria, dizendo até que a bacteria é indologena, o que não pudemos verificar.

Böheme verifica as relações sôrologicas da *Salm. psittacosis* com *S. aertricke*, quer quanto a agglutinibilidade quer quanto á acção protectora contra infecção experimental em coelhos e refere que Smidt a approximara da bacteria do hog-cholera (*Salm. suipestifer*). Esta relação de parentesco com a *S. aertricke* foi, nos ultimos tempos, confirmada por Perry. Selter isola de papagaios cinzas salmonellas que agglutinam bem em sôros de *S. schottmülleri* e *S. suipestifer*.

A custa de provas de saturação de agglutininas, depois de ter verificado a agglutinibilidade da amostra de Nocard com as *S. aertricke* dos typos mutton e newport, e com a *S. schottmülleri*, demonstrou Perry que

a amostra de Nocard satura o sôro *aertricke,* typo *mutton* e, vice-versa, o sôro daquella era saturado por esta bacteria. Com estes elementos Savage e White filiam o germen de Nocard ao typo *aertrycke* separando esta salmonella dos typos stanley e newport, á custa de provas sôrologicas, opinião adoptada por muitos bacteriologistas inglezes. Esta identidade foi ainda recentemente vista por Sara Branham.

Procurando fixar as caracteristicas bacteriologicas da *Salm. psittacosis,* Assis foi além de Perry, na confirmação das relações de bacteria com a *Salm. aertricke,* tentando approximal-a da *S. anatum* que Rettger e Scovile isolaram de patinhos atacados de uma doença conhecida por «Keel» e que descreveram em 1919. Esta hypothese não foi por nós confirmada pelo estudo bacteriologico de duas amostras de *S. anatum* (ns. 817 e 818 de A. T. C. C.) isoladas pelo seu descobridor, as quaes não apresentaram o parentesco previsto por Assis. O engano resultou da chave de classificação de Bergey no seu «Manual of Determinative Bacteriology» que, como demonstrámos em outro trabalho, é imperfeita a necessita revisão, revisão esta impossivel de ser feita sem estudo systematico das bacterias deste genero.

Basta uma vista d'olhos no quadro da fermentação dos assucares para se verificar que as duas salmonellas de papagaio, a *S. psittacosis* e a *S. nocardi* têm caracteres communs com outras especies do mesmo genero, mas possuem alguns caracteres biologicos que lhes são peculiares, podendo ainda as duas serem differenciadas entre si. Em nossos ensaios verificámos as propriedades biologicas da bacteria de Nocard, concordando os resultados com os de Seiffert e completando-os. A nosso ver a *Salm. psittacosis* pode ser talvez identificada com a *S. aertricke,* de accôrdo com os bacteriologistas inglezes, apezar das amostras que ensaiámos não terem saturado completamente o sôro *aertricke.* E' possivel, porém, que a nossa amostra não fosse dos typos *mutton* ou *newport* ou fosse impura do ponto de vista especifico.

Não é facil differenciar seguramente a *Salm. psittacosis* das outras salmonellas pelas provas culturaes, tornando-se indispensavel a execução de provas sôrologicas para isto. São-lhe peculiares, a agglutinação com sôro especifico, até o titulo, e coagglutinação alta em sôro *aertricke* e menos elevada em sôro *schottmülleri.* Do estudo minudente dos representantes da *S. psittacosis* que conseguimos obter concluimos, pois, ser esta bôa especie, resalvando a possibilidade de ser assimilada pela *S. aertricke,* segundo as vistas de Perry.

A separação das especies conhecidas como pathogenicas para aves, pode ser feita: da *S. gallinarum* por meio da producção de gaz nos assu-

cares, de que é incapaz esta bacteria; das *S. columbensis* e *pullorum* basta a fermentação da inosita, que é decomposta pela *S. psittacosis* e não o é por estas duas; a *S. columbensis* fermenta a salicina que a *S. psittacosis* não ataca. Nenhuma dellas tem parentesco sôrologico com a *Salmonella psittacosis*.

A *S. nocardi* se differencia pela producção de gaz nos assucares, propriedade que não possuem as salmonellas de gallinha. Ainda as propriedades sôrologicas da *S. nocardi*, rigorosamente especificas, permittem a sua distincção das salmonellas de aves e das outras salmonellas.

S. psittacosis e *S. nocardi* se distinguem uma da outra:

S. psittacosis—Movel Indol—Rhamnose + Dulcita + Xylose + *S. nocardi*—Immovel Indol + Rhamnose—Dulcita—Xylose—.

LITTERATURA REFERIDA

AJELO, G. e PARASCANDALO, C.—Della psittacosi studi ed esperimenti. Arch. de parasit. Vol. V, pp. 294-395, 1902.

ASSIS, A.—Em torno da caracterisação bacteriologica da *Salmonella psittacosis* Nocard, 1893. Brasil Medico, An. 43, pp. 307-313, 1930.

BACHEN, SELTER e PRIOR—Die von Zülpich im Sommer 1909, ausgehende Epidemie von lungenerkrankungen und der heutige Stand der Psittacosisfrage. Klin. Jarbuch, Vol. 23, pp. 539-594, 1910.

BEDSON, S. P. e WESTERN, G. T.—Observation on the virus of psittacosis. Brit. J. of exp. med. Vol. II, pp. 502-511, 1931.

—A disease of Parrots communicable to man. (Psittacosis). Etiology-eexperimental observations. Reports on Public Health and Med. Subj. n. 61, London, 1930.

BEDSON, S. P., WESTERN, G. I. e SIMPSON, L.—Observation on the etiology of psittacosis. Lancet, n. 5.553, pp. 235-236, 1930.

—Further observations on the etiology of psittacosis, Idem, n. 5.555, pp. 345-346, 1930.

BERGEY, D.—Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2th Ed., 1925.

BOEHME,—Ann. J. of Path. Vol. VI, p. 586, 1930.

BRANHAM, S. E., MC COY, G. e ARMSTRONG, C.—Bacillus psittacosis Nocard, 1893. Publ. Health Rep. Vol. 45, n. 37, pp. 153-2.160, 1930.

EIGLER, G.—Ueber die Ergebnisse diagnostischer und experimental bakteriologischer Studien zur Aetiologie der Papagaienkrankheit (Psittakose) des Menschen. Cent. f. Bakt., Vol. 119, pp. 406-426, 1931.

ELKELES, G.—Ueber die Berliner Faelle von Papagaienkrankheit. Münch. Med. Woch. An. 77, pp. 139-140, 1930.

—Zur Aetiologie der Psittakosis. Deut. Med. Woch. An. 56, pp. 619-620, 1931.

GORDON, M. H.—Virus estudies in relation to psittacosis. Rep. on Public Health and medical subjects. London, n. 61, 1930.

GREENE, U. T.—Psittacosis. Lancet I, pp. 1367-1.368, 1897.

GILBERT, A. e FOURNIER, L.—Le bacille de la psittacose. Compt. rend. Soc. Biol. T. 48, pp. 1.099-1.102, Munich, 1896.

HAEDKE, M.—Ueber endemische Pneumonie. Deut. Med. Woch. An. 42, pp. 220-222, 1898.

HOFFMANN, P. e REINECK, H.—Bakteriologische Untersuchungen uber die Psittakosis. Berl. Klin. Woch. An. 46, pp. 225-227, 1930.

—Idem. Berlin. Tierart. Woch. Vol. 46, pp. 225-227, 1930.

HUTCHINSON, R., ROWLANDS, R. A. e SIMPSON, S.—A study of Psittacosis. Brit. Med. J., n. 3.613, pp. 63-3646, 1930.

KRUMWIEDE, CH., MC GRATH, M. e OLDENBUSCH, C.—The etiology of the disease psittacosis. Science, Vol. 71, pp. 262-263, 1930.

LEICHTENSTERN—Ueber infectiose Lungenenzündung den heutigen Stand Psittakosis—Frage werden durch specifisch erkrankte Papagaien bösartige Lungenzündungen beim Menschen hervorgerufen ? Cent. f. allg. Gesuntheit. Ann. 18, f. 718. Ref. do Cent. f. Bakt. Vol. XXVI, pp. 631-653, 1899.

MC COY, G. W.—Accidental psittacosis infection among the personal of the Hygienic Laboratory. North. Am. Vet. Vol. II, pp. 15-16, 1930.

—Public Health Reports. Vol. 45, pp. 843-845, 1930.

MEYER, J. R.—Observações anatomo e histopathologicas feitas em orgãos de papagaios (*Amazona amazonica* e *A. farinosa*)

mortos expontaneamente e após inoculação de um virus que se demonstrou filtravel. Arch. Instit. Biol. Vol. IV, pp. 25-38, 1931.

NOCARD, E. e LECLAINCHE, E.—Les maladies microbienes des animaux. T. I, pp. 231-234, Pariz, 1903.

PACHECO, G.—Considerações sobre a classificação das salmonellas. Arch. Instit. Biol. Vol. II, pp. 209-217, 1929.

—Nouvelles recherches sur la psittacose des perroquets. Compt. rend. Soc. Biol. Vol. 106, p. 372, 1930.

—Nouvelles espèce de Salmonella pathogène. Différenciation avec l'espèce de Nocard. Compt. Rend. Soc. Biol., Vol. 106, p. 1.018, 1931.

PACHECO, G. e BIER, O.—Epizootia em papagaios no Brasil e suas relações com a psittacose. Arch. Inst. Biol. Vol. 4, pp. 89-120, São Paulo, 1931.

—Idem. Brasil Medico. Vol. 31, p. 830, 1930.

—Épizootie chez les perroquets du Brésil. Rélation avec la psittacose. Compt. rend. Soc. Biol. Vol. 105, p. 109, 1930.

PALAMIDESE, T.—Di un'infezione nell'uomo trasmessa probabilmente dei papagali. Policl. n. II. Ref. der Baumgartens Jahresb. An. II, p. 129, 1895.

PERRY, H. M.—The antigenic properties of B. psittacosis. Brit. J. Exp. Path. Vol. I, pp. 131-134, 1920.

PESCH, K. L.—Ueber den Erreger der Psittacosis. Münch. Med. Woch. An. 77, pp. 484-485, 1930.

REINECK, H. e HOFFMANN, P.—Bakteriologische Befunde bei Psittakosis. Deut. Med. Woch. An. 56, pp. 516-517, 1930.

RETTGER e SCOVILLE—Bacterium anatum. J. Inf. Dis. Vol. 26, p. 217, 1920.

RIVERS, T. M., BERRY, G. P. e SPRUNT, D. H.—I-Experimentally induced infections in parrots. J. Exper. Med., Vol. 54, pp. 91-103, 1931.

RIVERS, T. M. e BERRY, G. P.—II-Experimentally induced infections in mice. Idem. pp. 105-117, 1931.

RIVERS, T. M. e BERRY, G. P.—III-Experimentally induced infections in rabbits and guinea-pigs. Idem. pp. 119-128, 1931.

RIVERS, T. M. e BERRY, G. P. IV—Experimentally induced infections in monkeys. Idem. pp. 129-144, 1931.

SAVAGE, W. G. e WHITE, B.—An investigation of the Salmonella group,

with special reference to food poisoning. Med. Res. Council, Sp. Rep. S., n. 91, 1925.

SEIFFERT—Zeit. f. Hyg. Vol. 63, p. 273, 1909 (apud Bergey).

SELTER, N.—Die Erreger des Paratyphus und Fleichvergiftungen und ihre Beziehungen zur Hogcholeragruppe. Zeit. f. Hyg. und. Infekt. Vol. 81, pp. 387-400, 1916.

SICARD—Épidemie de psittacose. Recherches bactériologiques. Compt. rend. Soc. Biol. n. 28, p. 844. Ref. do Baumgartens Jahresb. An. 30, p. 654, 1897.

STURDEE, E. L. e SCOTT, W. M.—A disease of parrots communicable to man. (Psittacosis) Rep. on Public. Health and Med. Subjects, n. 61. London, 1920.

THOMSON, A. P.—Psittacosis with an account of cases of human infection. Lancet, n. 5525, pp. 115-117, 1929.

TRUCHE e BOUFFANAIS—Psittacose. Diagnostic. Tentative de vaccination. Bull. Cent. de Med. Vét. Vol. 49, pp. 464-465, 1923.

WARD, R. A. e GALAGHER, B. A.—Diseases of domesticated birds, p. 56, New-York, 1926.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

Fig. 1—Papagaio normal.
Fig. 2—Papagaio inoculado com virus—periodo de tristeza.
Fig. 3—Papagaio inoculado com virus—idem.
Fig. 4—Papagaio inoculado com virus—idem, com approximação de pessôas ou producção de ruidos extranhos.
Fig. 5—Papagaio inoculado com virus—estado adynamico, apoiando-se com o bico nas malhas da gaiola.
Fig. 6—Papagaio inoculado com virus—idem, apoiando-se sobre o sólo na falta de supporte aereo.
Fig. 7—Periquito inoculado com virus—estado agonico.
Fig. 8—Fezes de papagaio são.
Fig. 9—Fezes de papagaio inoculado com virus—liquidas e brancacentas.
Fig. 10—Fezes de papagaio inoculado com virus—consequencia da diarrhéa frequente.
Fig. 11—Papagaio inoculado com bacteria—fórma atrophica.
Fig. 12—Idem, idem.

ABSTRACT

The present paper colligates the notions acquired in previous investigations, already published, and new observations upon diseases of the psittacidae, liable to be confused with psittacosis of parrots.

The author calls attention to the indifference with regard to this question shown by investigators, even by those who dealt with the study of this disease on the occasion of the latest outbreak of psittacosis, in flagrant contrast with the researches upon the alterations induced by pathogenic agents of other diseases transmissible to man, when these agents pass through animals or when the latter are depositaries of the virus. This remark considerably enhances the importance of the presence paper from a hygienic and epidemiologic point of view, representing moreover a contribution to general knowledge and to veterinary medicine.

The researches carried out since the appearance of the latest outbreak of psittacosis,—which occurred simultaneously with an epizooty in parrots lodged in aviary of the park of Agua Branca (Directory of Animal Industry of the State São Paulo)—led to the verification of the frequent existence in these animals of various diseases liable to be confused with psittacosis. These diseases are due to two kinds of pathogenic agents: virus and bacteria. In the first group there are to be found the diseases occasioned by the virus of human psittacosis, discovered by Western, Bedson and Simpson, and the disease met with in parrots coming from traders in S. Paulo. The infections by bacteria of the genus *Salmonella* and by those of other genera belong to the second group.

As differential characters of the two infections due to virus, delineated on the strength of notions drawn from a detailed experimental study and from the literature on this subject, the following are given: [1]

Virus of psittacosis	Virus of S. Paulo
Infectiousness: man, monkey, rabbit, mouse, hen, canary.	Infects only psittacidae, particularly those of the genus *Amazona*.
Neurotropic affinity.	No localization in the nervous system.
Inclusions: small, protoplasmic.	Large, nuclear.
Exsiccation: the virus has good power of preservation.	Is rapidly destroyed.

[1] Samples of our virus were sent, for comparison, to various investigators of psittacosis. Amongst them, Prof. M. Rivers acceded to our request; he found its nature to be different from that of the virus of psittacosis studiedby him. We are very much obliged to him for the attention he paid to this verification.

Symptoms: inactivity, drowsiness, frequent diarrhoea, oculo-nasal discharge and cough, coma.	Inactivity, inappetency, adynamia (drooping of the wings, indifference, leaning its beak against the bars of the cage in order not to fall down); profuse diarrhoea, of whitish stools, at times enterorrhagia; prolonged coma.
Duration: 4 to 5 days.	2 to 8 days.
Bodily lesions: congestion of intestines, splenomegaly.	Foci of yellowish necrosis in liver, spleen and lung. At times, congestion of intestines.

Characteristic features common to the two viruses.—They act in great dilutions, filter through tight candles though being partly retained, are preserved under glycerine or Bedson's solution, are stable at 55°C. heat and are destroyed by physical and chemical agents.

Both virus diseases are very seldom met with in *psittacidae*: only once, amongst numberless sick parrots, the author met with a disease of the virus differring from that of psittacosis. This disease, greatly transmissible to man, ought to be more frequent, if it were common in parrots. On the contrary, bacteria cause diseases in these animals with great frequency, presenting variable characters, from a severe epizootic form, rapidly mortal, to ambulatory or silent forms, for the most part developing towards a cure or assuming a chronic character. Amongst the bacteria which cause the infection of this group the salmonellae predominate and amongst them the bacterium discovered by Nocard, as well as a species which in the course of this study is characterized under the name of *Salmonella nocardi*. The author believes that in the epizooty from which Nocard isolated his bacterium there was association of the virus-disease inducing the epizooty of that epoch in Paris with the bacterial disease, as must have happened in Argentina, where the disease was transmitted to man, and Santillan, according to Barros, isolated from the sick parrots bacteria of the genus *Salmonella*.

The diseases of the two groups, that due to virus and that due to bacteria, are differentiated:

Virus-diseases	Bacterial diseases
Evolution: rapid, nearly always followed by death.	Varies from one week to a month or more, not always fatal.
Symptoms: sadness, profuse diarrhoea, of whitish stools, at times enterorrhagia, complete inappetency, adynamia, indifference, prolonged coma.	Sadness, partial inappetency, tremblings, intensive thirst, mucous or mucosanguineous diarrhoea, lack of adynamia (reacts to stimulations and moves well at any time of the disease, though showing little disposition to locomotion), soiling of feathers.
Clinical forms: acute and subacute.	Frustrate, acute, subacute and chronic.
Lesions: Foci of necrosis in liver and spleen without cellular reaction around the focus, yellow liver, multiple serositis. Presence of protoplasmic or nuclear granulations.	Hepatic and intestinal congestion, foci of necrosis in liver, spleen and lung with cellular reaction around the focus. Lack of granulations.
Bacteriology: Complete lack or inconstant presence of bacteria in the organs and blood. Infectiousness of the organs and blood after filtration: positive.	Constant presence of bacteria in the organs and blood. Negative.

The analysis of the litterature shows that the characteristic features of the diseases in parrots referred to parrot psittacosis, more frequently approach the bacterial diseases here described of these animals, a hypothesis which is reinforced by the observation of the greater frequency of infections of this type noted in the course of the author's researches and, moreover, by the frequent reference in literature to infections, epizootic or not, in these animals which are not transmitted to man.

Certain difficulties were encountered in reproducing experimentally the bacterial diseases, in flagrant contrast with the virus-diseases which are easily reinoculated. The study of the natural conditions of the bacterial disease engendered the hypothesis of a necessary existence of peculiar conditions in order to induce the bacterial disease to appear, which conditions were confirmed by trials: states of avitaminosis engendered by alimentary monotony or inadequacy of the food (boiled maize) during a prolonged

time, or the repetition of oral inoculations. These conditions are observed in spontaneous infections, chiefly in animals found in trade or during travel, as may be inferred from the literature.

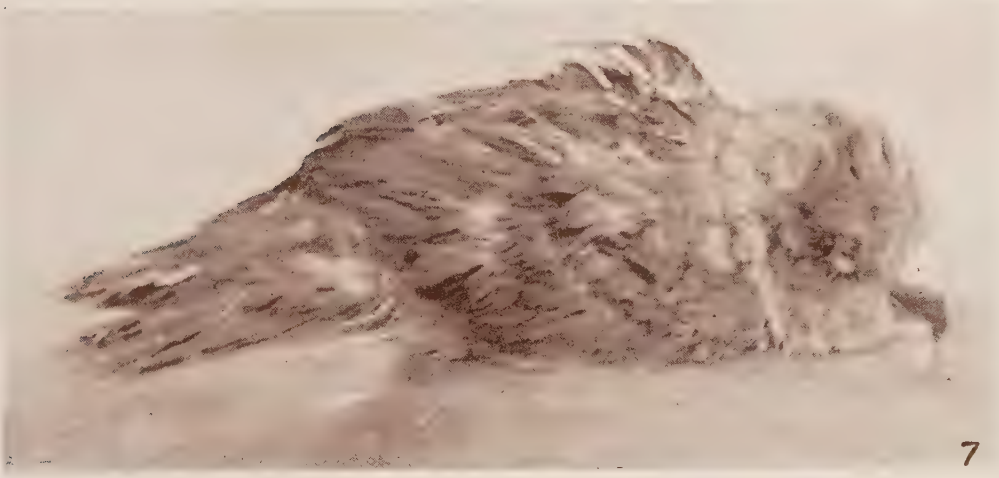
These conditions were again observed in an aviary of macaws, the death of which was prevented as soon as the alimentary regimen of boiled maize was changed to that of puffed maize by means of a prolonged immersion in water.

A detailed comparative bacteriological study was made of the bacteria isolated from sick and healthy parrots, together with samples of the same genus obtained from other experimenters and with samples of other known animal salmonellae. The species isolated by Nocard could be approximated to *Salmonella aertrycke*, as to its cultural and serological properties, in accordance with the English bacteriologists, although the 9 samples of the bacterium of Nocard, at our disposal, did not fully saturate the *aertrycke* serum, and two of them did not agglutinate in this serum. It is possible that the sample of *aertrycke* used for the preparation of the serum was impure, from a specific viewpoint. In order to differentiate *S. psittacosis* of Nocard from other salmonella the use of serologic tests is indispensable. The fermentation of sugars however allows of its differentiation from the other salmonellae which are pathogenic for fowl.

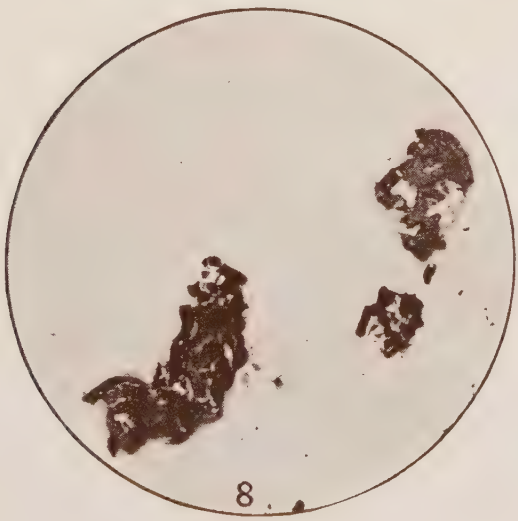
The new species of salmonella discovered by the author, the *S. nocardi*, differs from the species of Nocard by its immobility, production of indol and lack of fermentation of xylose, dulcite and rhamnose. By the gasogenic property it is easily distinguishable from another species encountered in fowls, also immobile but not producing gas by the fermentation of sugars.

Apart from the species referred to, other bacteria, particularly salmonella, not susceptible of being specified, can infect psittacidae (amongst them 2 samples received from Hoffmann and Reinecke, isolated by the same from man and animals stricken with psittacosis), provided some conditions exist which favour their penetration into the animal organism.

Genesio Pacheco : Investigações sobre doenças de Psittacideos.



Genesio Pacheco : Investigações sobre doenças de Psittacideos.



Genesio Pacheco : Investigações sobre doenças de Psittacideos.

Genesio Pacheco : Investigações sobre doenças de Psittacideos.

Nova especie de Anoplura (*)

(Haematopinidae)

pelo

DR. FABIO LEONI WERNECK

(Com as estampas XLV e XLVI).

Graças á gentileza do Prof. Mello Leitão, do Museu Nacional, tivemos a opportunidade de examinar exemplares de piolhos contidos num frasco da collecção do mesmo museu. Desse exame resultou uma communicação, por nós feita, na Sociedade Brasileira de Biologia, em sua sessão de 30 de dezembro de 1931, sobre uma nova especie do genero *Hoplopleura*, que ahi encontrei.

Terminados os estudos e desenhos do novo parasito, damos agora sua descripção original.

Hoplopleura brasiliensis, n. sp.

Femea. (figs. 1 e 2)

Comprimento. 1,54 mm.

Cabeça. Pequena, seu comprimento representado, apenas, 1/8 do comprimento total do especimen e ligeiramente mais estreita do que longa. Nitidamente dividida, por uma sutura, em duas porções; a anterior estreita e a posterior larga.

Bordo anterior arredondado, com pequenos pellos. Bordos lateraes salientes por traz das antennas. Bordo posterior formando um angulo na linha mediana, angulo esse que se insinúa, como uma cunha, no prothorax.

Antennas com 0,13 mm. de comprimento, tendo o 1º segmento muito mais robusto que os demais e o 2º longo e delgado. Dos restantes o maior é o ultimo, sendo o 3º e o 4º de tamanho muito reduzido. A fig. 5, melhor que qualquer descripção, dá bem uma idéa da fórma desses articulos e das respectivas dimensões.

(*) Recebido para publicação e 9 de Janeiro de 1932.

Thorax. Approximadamente tão longo quanto a cabeça e ligeiramente mais largo ao nivel do mesothorax.

Placa external larga e arredondada em sua porção anterior e adelgaçada na extremidade posterior, como mostra a fig. 6.

Abdomen. Longo e estreito, tendo de comprimento o dobro de sua largura. Bordo posterior arredondado.

Na face superior encontram-se 18 placas pigmentadas, todas providas de cerdas e com a superficie escamosa. Da 5° a 17°, a fórma dessas placas pouco varia, tendo cada uma dellas cerca de 8 pellos. As 4 primeiras e a 18° são bem differentes das demais e, tambem, differentes entre si. Na ultima encontra-se uma carreira de 10 cerdas fortes e longas, com o aspecto dos dentes d'um pente.

Na face inferior o numero de placas pigmentadas é de 17, sendo que as duas primeiras e as duas ultimas, têem forma muito distincta das intermediarias (fig. 2).

As placas pleuraes (fig. 7) são todas fortemente bilobadas, excepção feita para a primeira. Este caracter, por si só, basta para distinguir esta especie de todas as até hoje descriptas no mesmo genero. Effectivamente, dessas a unica especie conhecida com o 8° pleurito bilobado é a *H. pectinata*, mas n'esta o 2° pleurito é simples, emquanto que na *H. brasiliensis* elle é duplo. A fig. 8 (A e B) mostra bem a fórma dessas placas pleuraes caracteristicas. O 2°, o 7° e o 8° pleuritos têem cada um duas longas cerdas, emquanto que os outros apresentam apenas dois pequenos pellos.

A fig. 9 representa a face inferior da extremidade posterior do abdomen, mostrando a disposição das cerdas que ahi se encontram e a fórma dos gonopodos.

Macho. (figs. 3 e 4)

Comprimento. 1,37 mm.

Cabeça e Thorax. Como na femea.

Abdomen. Com a mesma fórma geral com que se apresenta na femea. Sua extremidade posterior, entretanto, é fortemente saliente.

Na face tergal, encontram-se apenas 9 placas pigmentadas, sendo que as 2 primeiras e a ultima têm fórmas muito differentes das demais.

As placas da face external são em numero de 12. As duas primeiras, além de terem fórmas proprias, são muito mais largas, tocando suas extremidades as placas pleuraes.

A genitalia acha-se representada na fig. 10. A placa basal é longa e estreita, os parameros são fortes, recurvados e têm livres as extremidades distaes. Endomeros e pseudopenis bem visiveis.

HOSPEDADOR: Esta especie foi encontrada num rato selvagem capturado no Estado de Goyaz, Brasil, e cuja especie não foi, infelizmente, determinada.

TYPO: Uma femea (nº 186 de minha collecção).

HALOTYPO: Um macho (nº 186 de minha collecção).

PARATYPOS: Em minha collecção:

4 femeas (nº 187, 188, 189 e 190).
4 machos (nº 190, 191, 192 e 193).

Na collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz:

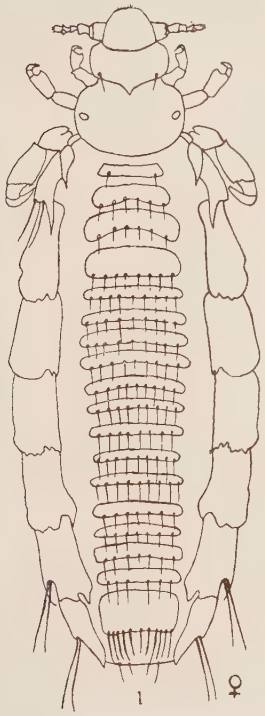
1 femea (nº. 1599).

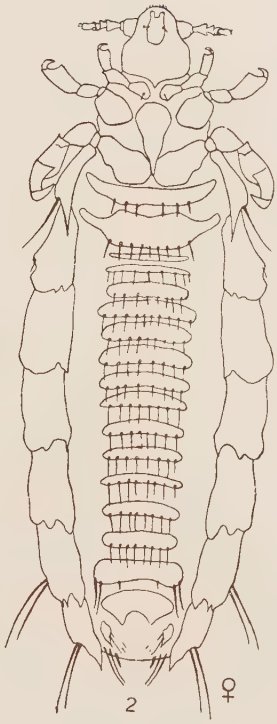
Na collecção do Museu Nacional, Rio de Janeiro:

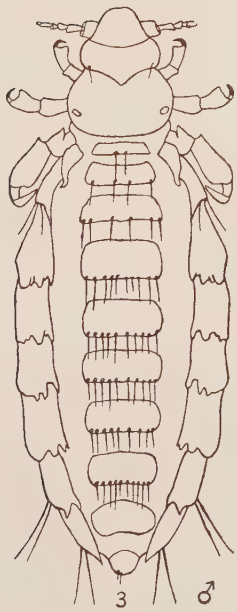
2 femeas (nº 13001 e 13002).
2 machos (nº 13003 e 13004).

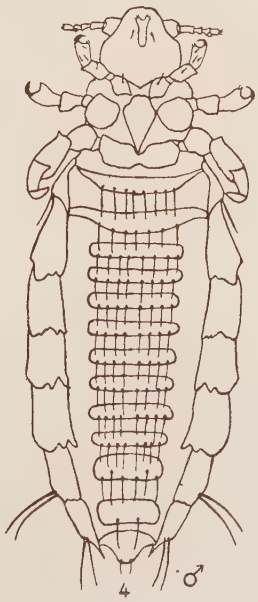
Numerosos exemplares, de ambos os sexos, conservados em alcool, no vidro 13.005.

O typo e o halotypo, que serviram para a descripção d'esta especie, bem como os paratypos são todos exemplares montados em balsamo, depois de tratados pela potassa caustica. Exceptuando-se, sómente, os exemplares do frasco 13005 do Museu Nacional.



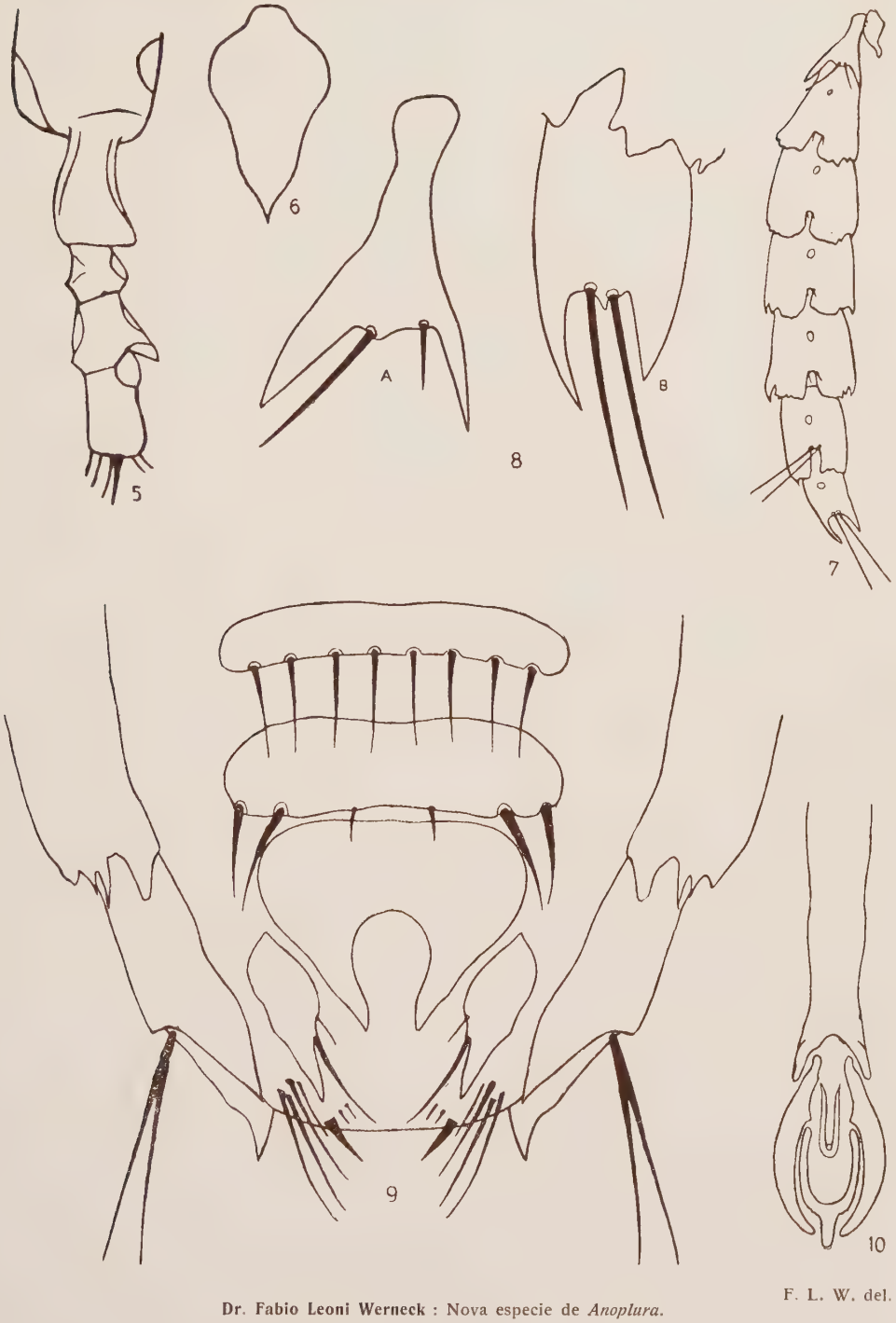






F. L. W. del.

Dr. Fabio Leoni Werneck : Nova especie de *Anoplura*.



F. L. W. del.

Dr. Fabio Leoni Werneck : Nova especie de *Anoplura*.

Reticulo-endotheliomatose maligna (*)

pelos

DRS. C. MAGARINOS TORRES e A. PENNA DE AZEVEDO

(Com as estampas XLVII—LIV)

E' sabido que a metastase dos tumores se processa, ora por invasão das vias lymphaticas regionaes e consequente propagação aos territorios organicos visinhos, ora por embolia blastomatosa, alcançando os embolos visceras distantes, mercê da via sanguinea ou lymphatica. Com mais frequencia, os dois methodos occorrem conjunctamente. Em casos menos numerosos, o apparecimento de tumores em multiplas localisações se faz de modo simultaneo, como se em taes pontos fosse a um só tempo observado o estado constitucional que favorece a formação de blastomas.

Assim Major (caso de Lewis) menciona até nove blastomas de estructura histologica diversa, alguns benignos, outros malignos, em um mesmo individuo.

Não é raro que diversos de taes tumores multiplos apresentem caracteres de malignidade. E' possivel que alterações congenitas e evolução defeituosa dos tecidos (causas endogenas congenitas, «constituição», «constellação») entrem em jogo em taes circumstancias (Puhr).

Tambem a origem independente de um determinado typo de blastoma em multiplas sédes é a regra em alguns de seus grupos (fibroma molluscum, myoma, lipoma, etc). Esta feição, porém, não é habitual, poderiamos mesmo dizer que é excepcional na variedade endothelioma ou «endothelioma», como conviria escrever a exemplo de Robertson.

Processos blastomatosos originarios do apparelho reticulo-endothelial só recentemente vem sendo assignalados. O seu estudo é particularmente difficultado pela confusão, ou melhor, complexidade do grande grupo de tumores rotulados como «endotheliomas».

Em recente trabalho de conjuncto sobre o assumpto, Puhr propõe a systematisação que abaixo transcrevemos para as alterações progressivas do apparelho reticulo-endothelial.

(*) Recebido para publicação a 16 de Junho de 1932.

PROCESSOS PROGRESSIVOS DO APPARELHO RETICULO-ENDOTHELIAL (segundo PUHR).

I. HYPERPLASICOS

1. Leucemia monocytaria.

2. a) Reticulose aleucemica (Goldschmid e Isaac).

b) Sarcoma idiopathico da pelle (Kaposi).

c) Sarcoide cutaneo (Spiegler).

3. Reticulose secretoria.

a) Doença de Gaucher.

b) Xanthomatose generalisada.

c) Espleno-hepatomegalia com cellulas lipoidicas (Pick).

II. BLASTOMATOSOS

1. *Benignos*

a) Circumscriptos

a) Epulis sarcomatosa.

b) Sarcoma benigno de cellulas gigantes da medulla ossea dos ossos longos.

b) Tumores pardos generalisados da osteitis fibrosa.

2. *Malignos*

a) Hemangio-endothelioma circumscripto (reticulo endothelioma malignum).

I do figado
II do baço
III da medulla ossea.

b) Hemangio-endotheliomatose generalisada (reticulo-endotheliomatosis maligna) (Grabowski).

O interesse do caso que apresentamos está no facto de se tratar de tumores que apparentemente se originam a um só tempo no apparelho reticulo-endothelial de diversas visceras quaes o figado, baço, ganglios lymphaticos e capsulas suprarenaes em individuo que de outro lado apresenta um sarcoma de cellulas fusiformes da duramater com erosão e perfuração da calote craneana.

E' evidente que no caso acima, a ideia mais simples e a primeira que nos occorreu quando realizamos a autopsia, foi a de que as lesões vistas no figado e ganglios lymphaticos representassem metastases do tumor maligno encontrado na dura-mater; poderia ser um endothelioma da duramater evoluindo posteriormente para um fibrosarcoma e produzindo metastases em visceras distantes. E' verdade que Ewing diz textualmente a proposito do endothelioma da dura-mater: «Metastases are extremely rare, but Klebs found nodules in the lung in one case, and Lindner is said to

have observed a metastasis in the bladder». Winchell Mc. K. Craig diz: «It is generally believed that intracranial endotheliomata are encapsulated, that they compress but do not invade the brain, and seldom metastasize. They do, however, frequently invade the dura and overlying cranial bone, and if the involved dura and skull are removed at operation the tumor kill not recur. Such tumors are supposed to arise from nests of arachnoid cells and from cells accompanying the arachnoid villi which pierce the dura and project into the venous sinuses».

Posteriormente, porém, fazendo o estudo microscopico modificamos tal opinião. Na dura-mater a estructura é a de um sarcoma de cellulas fusiformes; era natural que se os nodulos nas outras visceras fossem metastases desse tumor, houvessem de mostrar egualmente, a estructura de sarcoma de cellulas fusiformes. Ao contrario, ellas eram formadas por cellulas de nucleos claros com os caracteres quer cytologicos, quer architectonicos geralmente assignalados para o endothelioma. Não só no figado, baço e nos ganglios lymphaticos, mas tambem nas suprarenaes encontramos nodulos todos com estructura sensivelmente identica de tumor epithelial que apparentemente se originasse do apparelho reticulo-endothelial de taes orgãos.

Sendo bem conhecidas, de outro lado, as relações estreitas que o fibrosarcoma da dura-mater apresenta com o endothelioma das leptomeninges, achamos provavel que no caso presente se trate de um endothelioma multiplo originando-se simultaneamente do apparelho reticulo-endothelial de muitos orgãos, soffrendo posteriormente, em um delles, a dura-mater, a transformação sarcomatosa. Seria, em resumo, o que Puhr na systematisação atraz referida define como reticulo-endotheliomatose maligna.

Trata-se de um homem de côr parda, de 17 annos de edade, autopsiado 11 horas após a morte (Autopsia nº 5118, Hospital S. Francisco de Assis).

Descollado o couro cabelludo observamos implantada sobre o occipital, e alcançando em pequena extensão a porção posterior do parietal de ambos os lados, uma massa globulosa, firme, esbranquiçada, medindo, externamente, 6,5 × 6 × 3 cms. (Fig. 1). Ao passo que as adherencias desse tumor ao couro cabelludo são facilmente desfeitas, adhere elle de modo tão firme aos ossos do craneo que impossivel se torna a sua separação. Retirada a calote verifica-se perfuração dos ossos parietaes e occipital, tendo-se formado um orificio de fórma irregularmente circular, medindo 3 × 3 cms. Este é inteiramente preenchido pelo nodulo atraz descripto, o qual se continua na face interna do craneo com outra formação, egualmente bosselada, de consistencia firme, a implantada sobre a dura-mater na região parietal

e com ella apresentando continuidade de estructura (Fig. 2). O cerebro ao nivel do lobo parietal direito apresenta uma depressão na qual vem se alojar o tumor. Convem notar que mesmo nesse ponto, as leptomeninges são transparentes e delgadas sendo que o blastoma de modo algum invade o proprio tecido nervoso com o qual apresenta apenas relações de vizinhança. Córtes successivos do encephalo não mostram alterações grosseiras da substancia nervosa. Os plexos choroides dos ventriculos lateraes mostram aspecto normal. O liquido cephalo-racheano é limpido e não augmentado de quantidade.

O figado mostra notavel invasão por tecido blastomatoso sendo o seu peso augmentado para 4.700 grs. Embora numerosos, os nodulos vistos á superficie do orgão, são de fórma approximadamente redonda, com uma parte central deprimida e umbelicada, e não muito volumosos; o seu diametro médio é de 15 mms. Os córtes revelam na espessura do parenchyma, formações semelhantes, assaz numerosas, sendo que até 20 diversas pódem ser contadas em um unico córte. Algumas são bem maiores que as vistas á superficie, o seu diametro por vezes alcançando 5 e 6 cms. As maiores mostram uma parte central amollecida, em via de desintegração hemorrhagica. (Fig. 3).

Ha tambem nodulos do tumor nos ganglios lymphaticos do hilo do figado e no baço.

Sendo ligeiramente augmentado de volume e pesando 250 grs. o baço mostra na superficie do córte, de côr vermelha muito escura, tres ou quatro nodulos menores que um grão de arroz, mal limitados, de côr amarellada, os quaes correspondiam microscopicamente a nodulos blastomatosos.

Embora hoje se saiba que os blastomas metastaticos no baço sejam mais frequentes do que outróra se suppunha, a sua verificação é sempre interessante, tanto mais quanto, no nosso caso, representa elle um blastoma originando-se primariamente no tecido reticulo-endothelial do baço, como no do figado e ganglios lymphaticos. A porcentagem de blastomas metastaticos no baço é orçada geralmente em 1,76 % (Yokoata). Hausemann obtem uma cifra mais elevada, que é a de 4,3 %. Isso diz respeito geralmente á metastases reconheciveis macroscopicamente. Quando, porém, se usa o methodo de Christeller, tal como fez Yokoata, encontram-se metastases em 20 % dos casos de cancer.

Admitte-se que taes metastases microscopicas entrem posteriormente em regressão, conforme acontece muitas vezes a embolos neoplasicos localizados mesmo em visceras especialmente favoraveis ao seu desenvolvimento; haja visto o que diz Ewing sobre a implantação de metastases nos ganglios lymphaticos.

Conforme dissemos, interpretamos a principio, o caso como sendo um sarcoma primitivo da dura-mater com metastases nas visceras restantes. O estudo microscopico detalhado nos levou a modificar a primitiva opinião. Vejamos a principio a estructura do blastoma da dura-mater. E' um tumor densamente cellular cujos elementos arranjados de modo compacto são fusiformes e separados por estroma conjunctivo não abundante (fig. 5). A sua estructura é a de um sarcoma de cellulas fusiformes. Na massa principal do blastoma ha pontos onde os elementos são de fórma arredondada, com nucleos pobres de chromatina, nucleolos pequenos, os quaes afastando-se entre si formam cavidades revestidas pelas proprias cellulas blastomatosas, aspecto que vagamente lembra um acinus glandular (fig. 6). A estructura das cellulas em outros fócos concorda muito com a descripção que Ewing attribue ás cellulas do endothelioma. São essas aliás as caracteristicas que, juntas á sede em que é verificado, permittem suppôr que o blastoma, em muitos pontos da dura-mater, com a estructura de um sarcoma fusocellular, represente a evolução progressiva de um endothelioma. O tumor se localiza ao folheto interno da dura-mater, conforme nos mostra a fig. 4. Nella o folheto externo, espesso e percorrido por numerosos vasos, occupa o angulo esquerdo e inferior, não sendo invadido pelo blastoma.

No estudo microscopico do figado devemos distinguir o aspecto visto nos nodulos volumosos assignalados macroscopicamente e o aspecto do orgão fóra de taes nodulos.

Os nodulos volumosos não são nitidamente demarcados, nem separados do tecido hepatico por uma capsula conjunctiva definida, mas em muitos pontos as cellulas do volumoso nodulo se prendem por prolongamentos estreitos a outras collecções de cellulas tumoraes de pequenas dimensões, situadas no tecido hepatico adjacente.

Outros caracteres chamam a attenção ao exame microscopico do referido nodulo, a saber: a uniformidade do typo da cellula tumoral, o arranjo que essas mesmas cellulas apresentam, collocando-se nas margens de espaços pequenos, apoiadas sobre um septo conjunctivo ou estroma, pouco desenvolvido.

As cellulas possuem um nucleo unico de fórma oval, irregular, pobre de chromatina, encerrando um a tres nucleolos. O cytoplasma é apparente em certos elementos como estructura corada fortemente em roseo pela eosina, pouco abundante, excedendo apenas o nucleo em 2 ou 3 pontos. Na maioria das cellulas, porém, esse cytoplasma é muito reduzido, o elemento parecendo formado em grande parte sómente pelo nucleo claro, arredondado. Algumas cellulas, porém, nas quaes o cytoplasma é mais

abundante, apresentam fórma polyedrica. Taes cellulas polyedricas, por vezes, se juxtapõem em pequenas fileiras.

Um tal arranjo em fileiras continuas esboça um revestimento endothelial, tanto mais que as fileiras de cellulas se dispõem ao longo de estreitas cavidades ou fissuras presentes em diversas zonas do nodulo. Em certos pontos onde um delicado mas nitido estroma fibroso sustenta as cellulas, tal aspecto de «endothelio de revestimento» é muito nitido no tumor. Figuras de phagocytose não apresentam as cellulas do tumor. Tambem o seu cytoplasma não é vacuolado nem contém substancias coradas pelos reactivos de gordura, tal como se vê no hemangio-endothelioma do figado, descripto pelo Puhr.

A abundante vascularisação do tumor por capillares delgados e a presença de extensas areas de necrose e de hemorrhagias são outras lesões encontradas nos nodulos volumosos.

O aspecto microscopico, porém, realmente caracteristico deste tumor é o que elle apresenta em pleno parenchyma hepatico, distante dos nodulos macroscopicamente reconheciveis.

Os nodulos do tumor ahi constam de pequeno numero de cellulas e estas sempre se dispõe em torno de uma luz central. Taes tubos de cellulas tumoraes alternam de um e outro lado das traves de Remak com sinusoides hepaticos cheios de hematias e embora a sua luz não encerre sangue dão a impressão de que o tumor de facto se origine de uma hyperplasia do epithelio de revestimento dos sinusoides do figado (fig. 9). Estudados taes córtes, dir-se-hia que em certo trajecto os sinusoides soffreram uma transformação blastomatosa á custa de seu proprio endothelio, ao passo que em outros pontos de seu trajecto conservam-se inalterados. O exame com forte augmento (objectiva de immersão) revela ainda a existencia de cellulas tumoraes isoladas diffundidas em pleno lobulo hepatico. Taes cellulas apresentam uma situação e, ás vezes tambem, um aspecto morphologico semelhante ao de cellulas de Kupfer, figuras de mitose e de phagocytose sendo nellas evidenciadas. Tal aspecto é bem o indicio de quão diffusa é de facto a invasão do figado pelo blastoma neste caso. Taes aspectos suggerem fortemente uma origem «in loco» e multicentrica deste tumor á custa do apparelho reticulo-endothelial do figado.

No baço as cellulas tumoraes formam pequenos grupos ou nodulos de dimensões semelhantes ás de um corpusculo de Malpighi, mas situadas em plena polpa vermelha. Em taes nodulos, cujos limites tambem pouco a pouco se confundem com o parenchyma adjacente, as cellulas do tumor se dispõem em fileira e marginam estreitas cavidades cuja luz é apparentemente vasia. Em seu conjuncto e tambem pelo typo das cellulas que os formam, taes nodulos muito se assemelham aos nodulos pequenos do figado,

e aqui, como lá, elles parecem se formar á custa do endothelio dos sinusoides do proprio orgão.

Como no figado, tambem no baço encontramos aspectos suggerindo uma origem in loco e multicentrica do tumor e com diffusão extrema do blastoma. Assim, afóra os pequenos nodulos acima referidos, podemos encontrar em outros pontos delles afastados, estructuras lembrando seios venosos normaes da polpa vermelha do baço, mas na realidade correspondendo ao blastoma, conforme attestam a proeminencia do endothelio de revestimento de taes seios, a estructura das proprias cellulas e a ausencia de elementos figurados em sua luz (fig. 14).

Nos ganglios lymphaticos o blastoma é formado por cellulas de nucleo claro, do mesmo typo visto no figado e no baço. Occupa a substancia lacunar e em certos pontos o aspecto microscopico lembra algum tanto o que se vê na lymphadenite catarrhal simples. Ordinariamente, porém, as cellulas formam massas mais ou menos compactas tal como a representada na figura 15. Embora aqui, os aspectos suggestivos de uma origem do tumor á custa do endothelio de revestimento dos seios lymphaticos não sejam pronunciados, uma tal origem possivel não poderia naturalmente ser excluida.

O estudo microscopico minucioso das capsulas suprarenaes revela, ainda, a presença de nodulos tumoraes formados apenas por 3 ou 4 fileiras de cellulas blastomatosas, de nucleo claro dispostas em torno de uma luz estreita, lembrando em tudo as formações que assignalamos no figado e no baço. Taes formações se localisam na zona fasciculada da cortical, proximo á glomerular, suggerindo, tambem, uma origem in loco do tumor á custa de elementos do apparelho reticulo-endothelial (fig. 16). Conforme é sabido a camada cortical das suprarenaes é uma das localisações reconhecidas para os elementos do apparelho reticulo-endothelial.

RESUMO

Em um homem de 17 annos de edade, de côr parda, foi observado um fibrosarcoma que se origina na dura-mater, invadindo e perfurando os ossos da calote craneana nas regiões occipital e parietal de ambos os lados. O tecido nervoso não é invadido, a unica lesão consistindo em uma depressão onde vinha se alojar a massa tumoral intracraneana.

No figado, ganglios lymphaticos do hilo do figado, baço e capsulas suprarenaes do mesmo individuo, a autopsia e o estudo histologico revelaram nodulos multiplos de um tumor que em todas essas situações variadas mostra uma estructura sensivelmente a mesma. As cellulas de nucleo oval irregular, volumoso, relativamente pobre de chromatina, com 1 a 3

nucleolos, mostram um cytoplasma escasso e por vezes um arranjo caracteristico em fileiras. Taes fileiras se dispõem em torno de estreitas cavidades ou fissuras, á maneira de um endothelio de revestimento.

No figado, fóra dos nodulos macroscopicos, em pleno parenchyma hepatico, não é raro encontrar traves de Remak de um lado marginadas por sinusoides hepaticos typicos distendidos pelo sangue e de outros tubos de dimensões sensivelmente eguaes formados por cellulas do tumor dispostas em fileira em torno de uma luz central. Os aspectos suggerem que o tumor se origina dos sinusoides do figado em pontos multiplos simultaneamente.

O caso é interpretado como representando um endothelioma multiplo derivando-se simultaneamente do apparelho reticulo-endothelial de muitos orgãos e soffrendo posteriormente em um delles, a dura-mater, a transformação sarcomatosa.

Corresponderia ao que Puhr define como reticulo-endotheliomatose maligna na sua recente systhematisação dos processos progressivos do apparelho reticulo-endothelial.

SUMMARY

A spindle-cell sarcoma (fig. 5) apparently originating from the dura (fig. 4) was found at the autopsy of a male, mulato, 17 years of age. The bones of the skull (occipital and both parietals) were penetrated and destroyed (fig. 1 and 2). The nervous tissue was not penetrated, the only change in the brain being a depressed area where the tumor was included

Metastatic nodules were found in the liver (fig. 3), hepatic lymph-nodes (fig. 14), spleen (fig. 12) and suprarenal bodies (fig. 15). The structure, however, in all those different locations was that of a typical endothelioma (figs. 8, 11 and 13). The cells are of large and moderate size, of polyhedral form, with vesicular nuclei, diminutive nucleoli and clear cytoplasm. (Figs. 6 and 8). They are arranged about a central lumen which represents a rudimentary vessel (figs. 9 and 13). Other areas are composed of cells without concentric arrangement (figs. 4 and 10).

In small areas, the colums of liver cells are marginated in one side by typical sinusoids, while in the other side tumor cells arranged about a narrow lumen are seen suggesting a pathological (neoplastic) sinusoid (figs. 7 and 9).

The case is considered as a multiple diffuse endothelioma.

The origin of the tumor is referred to the reticulo-endothelial apparatus of the liver, the spleen, the suprarenal bodies and the lymph nodes, the structure being rather uniform in those organs. In the dura, the endo-

thelioma reproduces the structure and presents the general character of a fibroblastic sarcoma; in some places, however, the structure of endothelioma could be found (fig. 6).

It corresponds to the reticulo-endotheliomatosis maligna according to Puhr's grouping of progressive changes in the reticulo-endothelial apparatus which is as follows:

I. HYPERPLASTIC

1. Mnnocytic leukemia.

2. a) Aleukemic reticulosis (Goldschmid and Isaac).

   b) Idiopathic sarcoma of skin (Kaposi).

   c) Cutaneous sarcoid (Spiegler).

3. Secretory reticulosis.

   a) Gaucher's disease.

   b) Generalized xanthomatosis.

   c) Spleno-hepatomegaly with lipoidic cells (Pick).

II. BLASTOMATOSUS OR NEOPLASTIC

1. *Benign*

a) Circumscribed tumors.

   a) Epulis sarcomatosa.

b) Benign giant-cells sarcoma of the bone-marrow of long bones.

b) Generalized brown tumors of osteitis fibrosa.

2. *Malignant*

a) Circumscribed haemangio-endothelioma (reticulo-endothelioma (malignum).

of { liver, spleen, bone-marrow }

b) Generalized haemangio-endotheliomatosis (reticulo-endotheliomatosis maligna) (Grabowski).

LITTERATURA

ASHURST—Annals of Surgery, 1920, vol. 72, p. 404.
CRAIG, W. MC. K.—Surg. Gyn. and Obst., 1927, vol. 45, p. 760.
EWING—Neoplastic Diseases, 1919, p. 305.
KETTLE—Proc. of the Roy. Soc. of Med., 1917-18, vol. 11, p. 19.
KETTLE and ROSS—The Lancet, 1921, vol. 1, p. 1012.
LICHTWITZ—Virch. Arch., 1903, Bd. 173, p. 380.
MAJOR—Johns Hopkins Hosp. Bull., 1918, vol. 29, p. 223.
PRYM.—Virch. Arch., 1914, Bd. 215, p. 212.
PUHR—Zeitschr. f. Krebsforschung, 1926, Bd. 24, p. 38.

PUHR—Klin. Wochenscrift., 1931, nº 35, p. 1631.
PUHR—Zeitschr. f. Krebsforschung, 1931, Bd. 34, p. 503.
RIBBERT—Virch. Arch., 1910, Bd. 200, p. 141.
ROBERTSON—The Journal of Cancer Res., 1924, vol. 8, p. 213.
SCHMIDT—Virch. Arch., 1902, Bd. 170, p. 429.
SCHRÖNBERG—Frankf. Z. Path., 1923, Bd. 29, p. 77.
SEECOF—The Journal of Cancer Res., 1924, vol. 8, p. 213.

EXPLICAÇÃO DAS ETAMPAS XLVII—LIV

ESTAMPA XLVII

Fig. 1—Vista externa da calote craneana mostrando o tumor originario da dura-mater o qual perfurou o occipital e parte dos parietaes.

Fig. 2—Vista interna da calote craneana. Na região occipital distingue-se o tumor o qual adheria intimamente á dura-mater, não penetrando no proprio tecido nervoso.

ESTAMPA XLVIII

Fig. 3—Nodulos do tumor no figado.

ESTAMPA XLIX

Fig. 4—Sarcoma localisado ao folheto interno da dura-mater. O folheto externo espesso e percorrido por numerosos vasos é visto no angulo esquerdo e inferior da photographia.

Fig. 5—Tumor da dura-mater visto com forte augmento. A estructura é a de um sarcoma de cellulas fusiformes.

ESTAMPA L

Fig. 6—Tumor da dura-mater. Em certas areas, as cellulas são arredondadas, com nucleos claros, cytoplasma pouco abundante. Entre ellas apparecem esboçadas cavidades (estructura lembrando endothelioma).

Fig. 7—No figado, em pontos afastados dos nodulos macroscopicos, as cellulas do tumor se dispõem em torno de uma estreita luz, o aspecto suggestionando uma origem do tumor á custa do endothelio dos sinusoides.

ESTAMPA LI

Fig. 8—As cellulas do tumor, de nucleo claro e cytoplasma pouco abundante, formam pequenos nodulos os quaes apresentam relações intimas com o apparelho reticulo-endothelial do figado.

Fig. 9—As cellulas do tumor revestem espaços claros lembrando sinusoides hepaticos. Diffusão extrema do tumor no parenchyma do figado. Por vezes as cellulas do tumor apparecem isoladas ou em pequenos grupos entre traves de Remak bem conservadas. A distincção entre taes elementos e as cellulas de Kupfer não é, por vezes, facil.

ESTAMPA LII

Fig. 10—Margem de um nodulo macroscopico do figado. Nota-se ausencia de capsula e penetração das cellulas tumoraes entre as traves de Remak as quaes, atrophiadas por compressão, ainda podem ser reconhecidas no meio do tecido do tumor.

Fig. 11—Nodulo do tumor na polpa vermelha do baço visto com fraco augmento.

ESTAMPA LIII

Fig. 12—Estructura do tumor no baço.

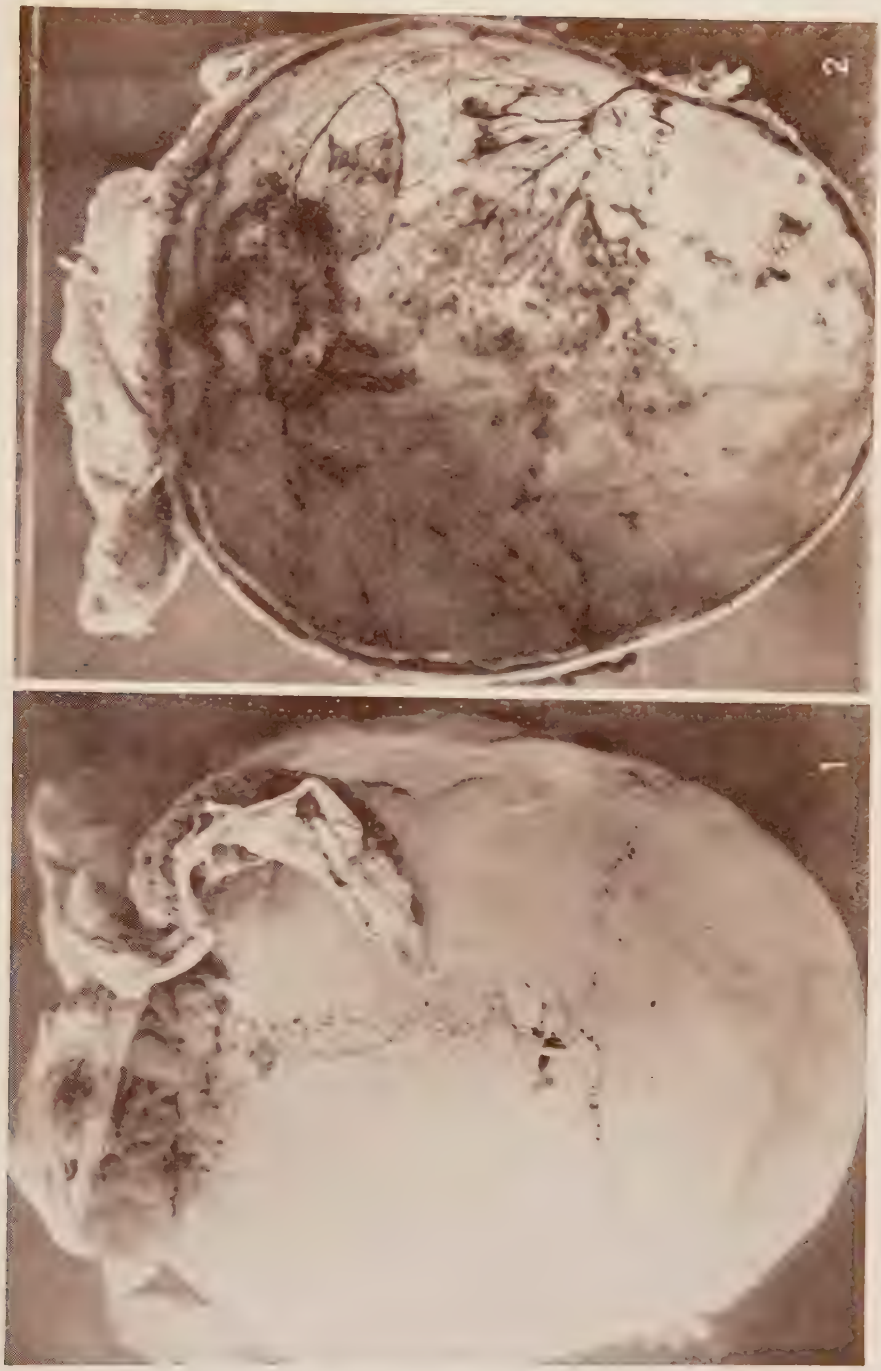
Fig. 13—As cellulas do tumor são proeminentes na luz de estreitas fissuras e esboçam os seios venosos do baço.

ESTAMPA LIV

Fig. 14—Estructura do tumor no ganglio lymphatico.

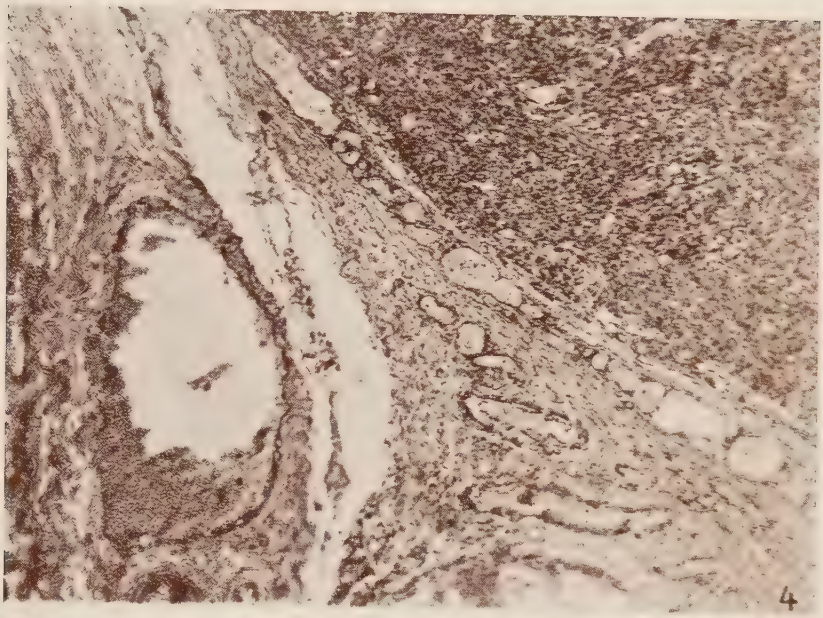
Fig. 15—Estructura do nodulo do tumor na zona fasciculada da suprarenal.

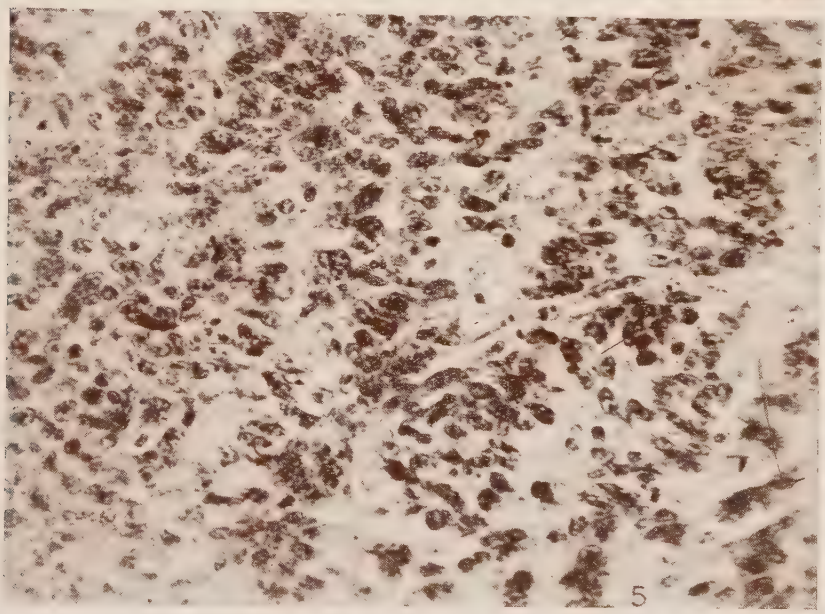
Tip. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.



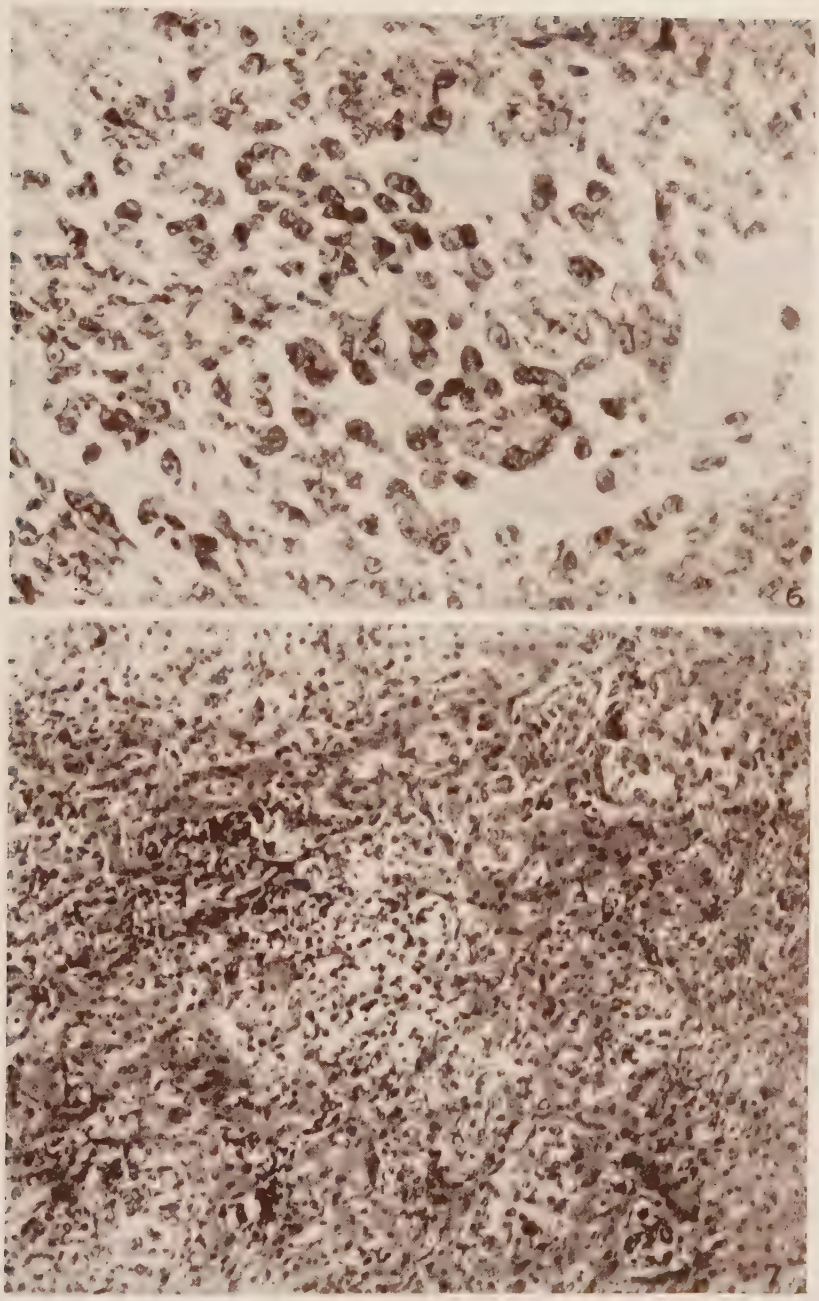
Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.

Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.

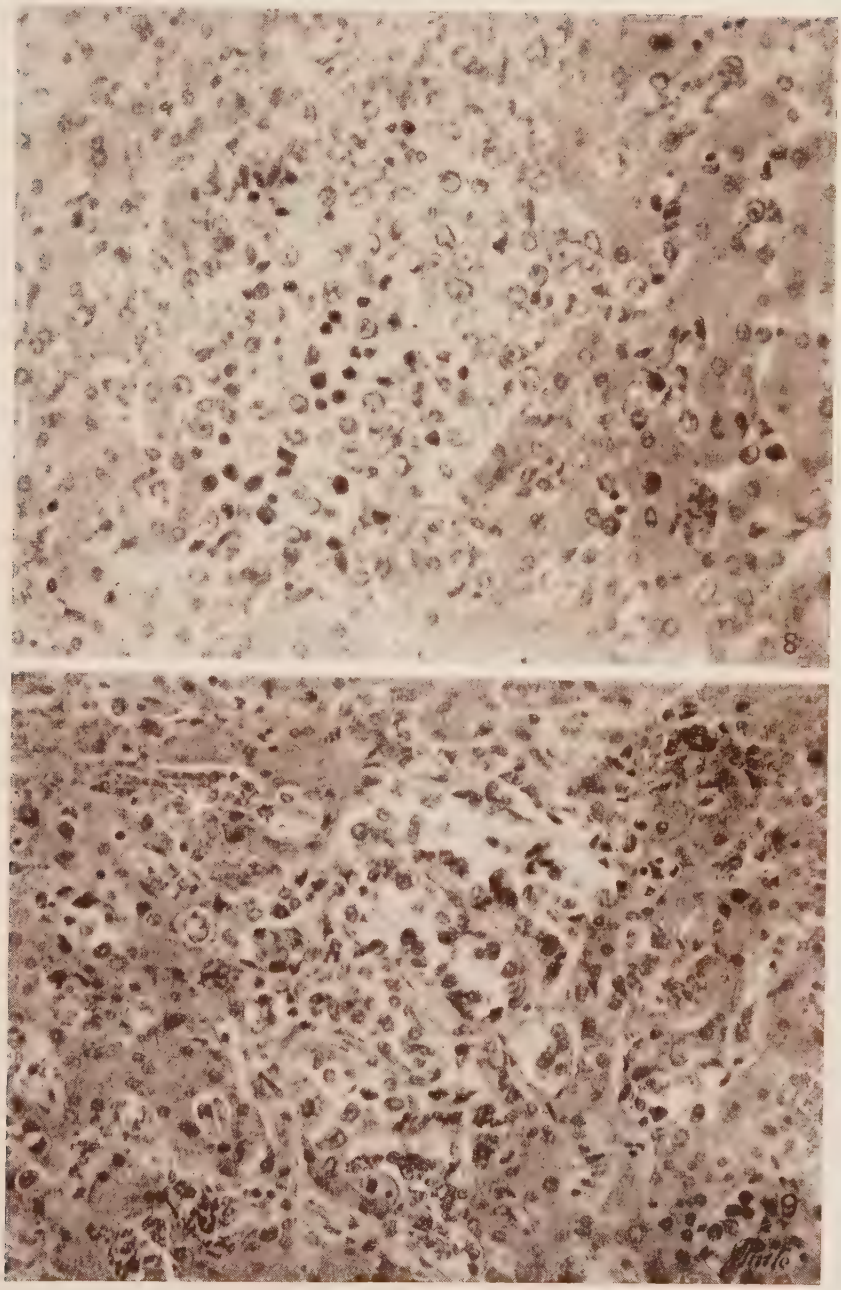




Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.

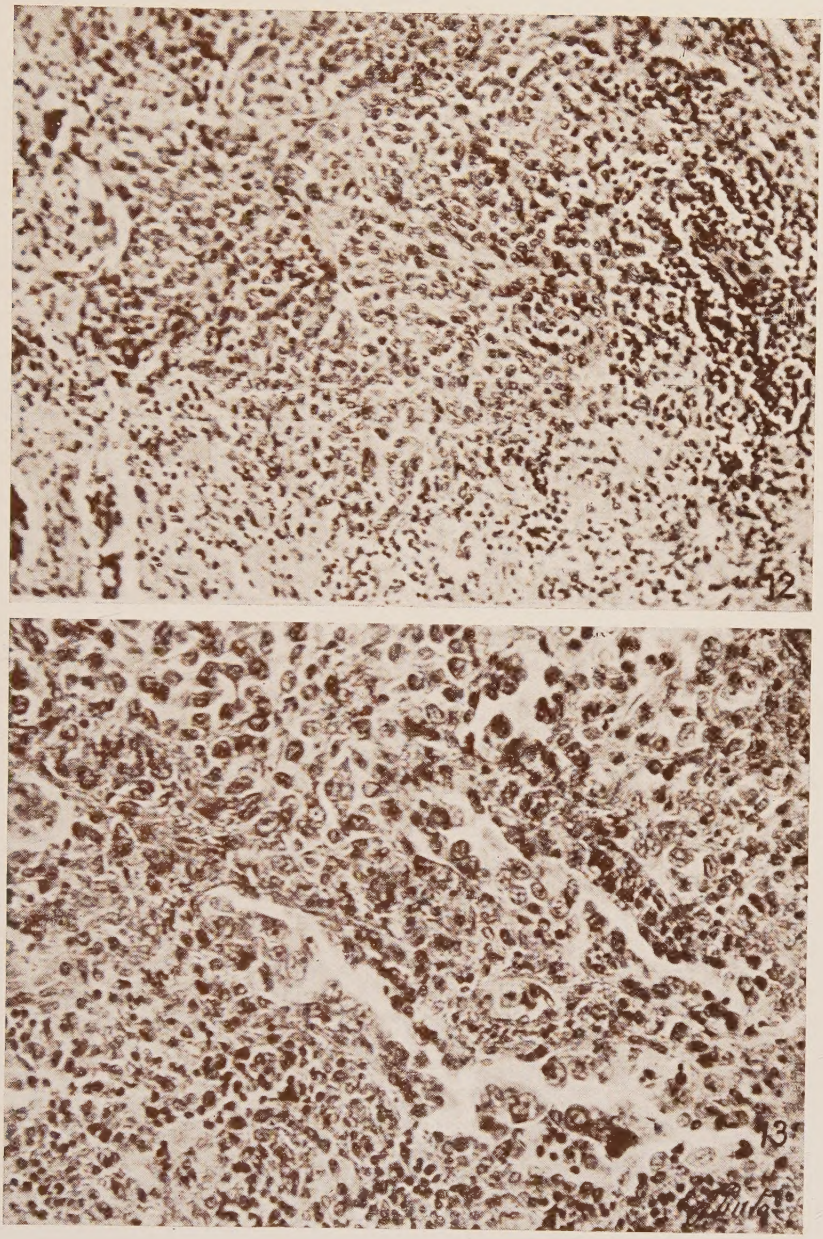


Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.

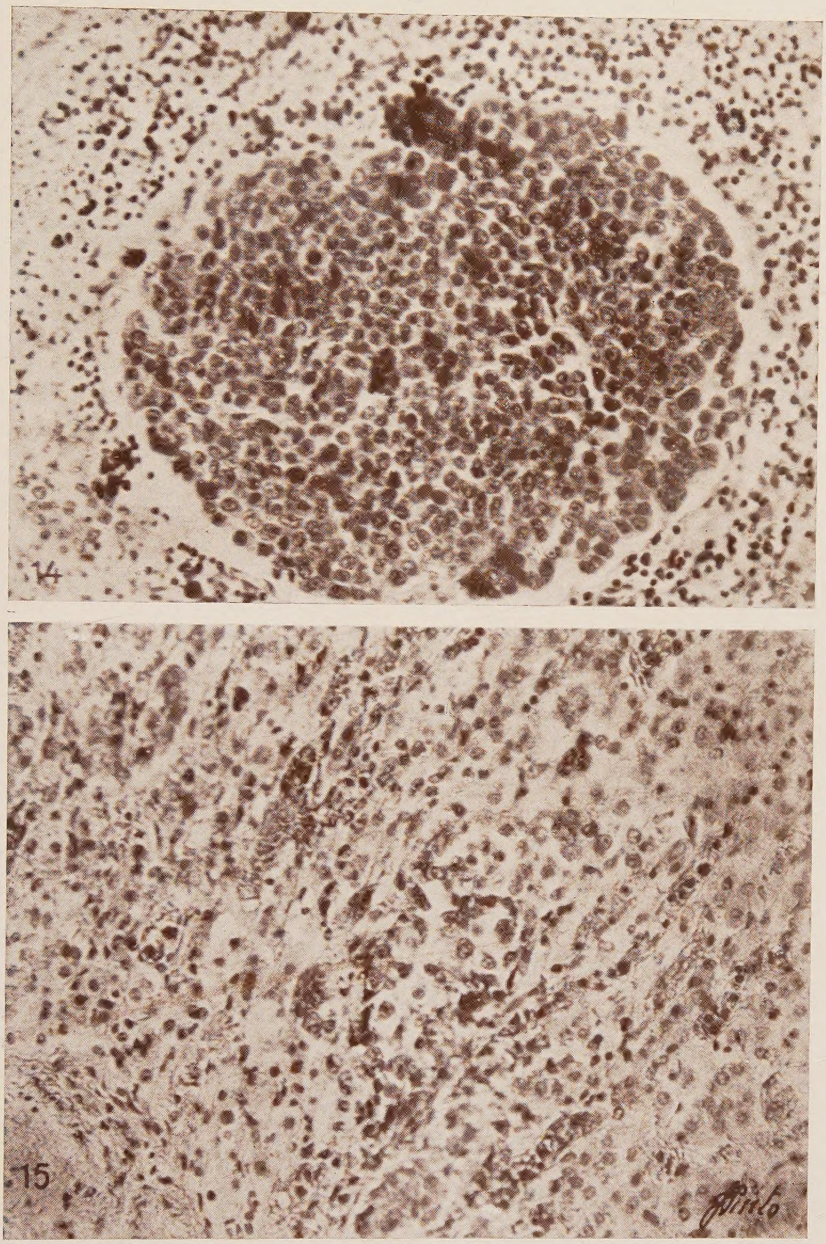


Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.

Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.



Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.



Drs. C. Magarinos Torres e A. Penna de Azevedo : Reticulo endotheliomatose maligna.